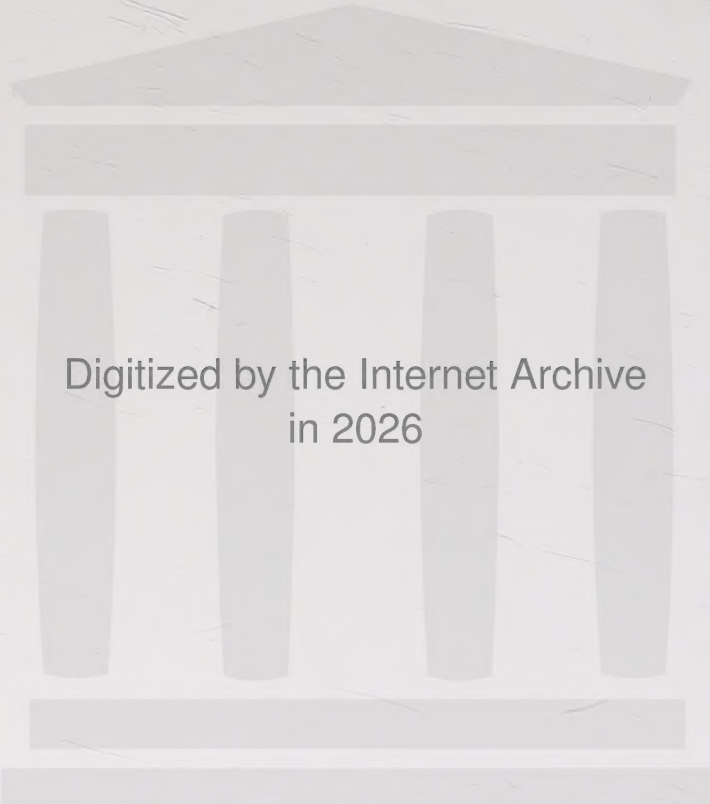


Isolierung und Eigenschaften einer
neuen Reversen Transkriptase
im Hühnersystem

GEORG BAUER

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555611_0078

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie
in Martinsried bei München
Abteilung für Virusforschung
Direktor: Prof. Dr. Dr. P. H. Hofschneider

Isolierung und Eigenschaften einer
neuen Reversen Transkriptase im Hühnersystem



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Georg Bauer
aus
Stammbach, Kreis Hof
(Oberfranken)

München 1976



1. Berichterstatter: Prof. Dr. F. Kaudewitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger

Tag der mündlichen Prüfung: 16. November 1976

MEINEN ELTERN

UND MEINER FRAU

GEWIDMET.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	1
Abkürzungen	3
A. EINLEITUNG	5
I. Allgemeiner Teil	5
1. Reverse Transkription	5
2. Eigenschaften der Reversen Transkriptase	6
3. Abgrenzung Reverser Transkriptasen von den üblichen DNA-Polymerasen eukaryonter Zellen	7
4. Auftreten Reverser Transkriptase	11
a) Reverse Transkriptase in Viren, virusinfiziertem und transformiertem Gewebe	11
b) Reverse Transkriptase in virusfreiem und nicht-transformiertem Gewebe?	12
5. Die Protovirushypothese	14
II. Spezieller Teil: Das System Hühnerzelle-Tumovirus	15
1. Die Hühner RNA-Tumoviren	15
2. Die Reverse Transkriptase der Retikuloendothelioseviren	16
3. Die Reverse Transkriptase der Viren der ALV/ASV-Gruppe	17
4. Die DNA-Polymerasen der uninfizierten Hühnerzelle	17
5. Anwesenheit viraler Sequenzen in der DNA uninfizierter Hühnerzellen	18
6. Expression virusspezifischer Gene in uninfizierten Zellen	19
III. Problemstellung	20
B. MATERIAL	21
C. METHODEN	22
1. Standardreaktionsansatz zur Messung der Aktivität Reverser Transkriptasen	22
2. Reinigung der Partikel	22

3. Gewinnung und Reinigung von AMV (Avian Myeloblastosis Virus)	24
4. Radioaktivitätsmessungen	24
5. Proteinbestimmung	25
6. Reinigung Reverse Transkriptase durch Affinitätschromatographie an p(C)-Sephrose	26
7. Sedimentationsanalyse von Enzymen in Glyceringradienten	28
8. IgG-Neutralisationstest	28
9. Dichtegradientenzentrifugation in Cs_2SO_4 (Nukleinsäuren)	29
10. Dichtegradientenzentrifugation in Rohrzucker (Partikel, Viren)	29
11. Reinigung des Reaktionsproduktes aus Reverse Transkriptase-Reaktionsansätzen	30
12. Standardbedingungen für den Verdau mit S 1-Nuklease	31
13. Alkaliverdau zur Gewinnung freier DNA	31
14. Hybridisationsansätze	32
15. SDS-Gelelektrophorese zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen	32
16. Weitere Methoden	34
D. ERGEBNISSE	35
I. Charakterisierung einer Reverse Transkriptase-tragenden Partikelfraktion	35
1. DNA-Polymeraseaktivitäten in der Allantoisflüssigkeit	35
2. Charakterisierung der Schwimmdichte der Partikel mit RNA-abhängiger DNA-Polymeraseaktivität	39
3. Abhängigkeit der RNA-abhängigen DNA-Synthese von der Zeit und der Partikelkonzentration	40
4. Charakterisierung der Homopolymer-abhängigen reversen Transkription durch das partikelgebundene Enzym	42
5. Reverse Transkription heteropolymerer RNA durch das partikelgebundene Enzym	44

6. Verbreitung der Reverse Transkriptase-tragenden Partikel	46
7. Weitere Charakterisierung der "Partikel" durch Herstellung einer hochgereinigten Präparation	50
8. Vergleichende Untersuchungen von Partikeln und Hühner-RNA-Tumurviren	57
a) Physikalische Eigenschaften	57
b) Biologische Eigenschaften	60
c) Proteinzusammensetzung	63
d) Morphologische Eigenschaften	66
II. Charakterisierung des gereinigten Enzyms	73
1. Reinigung des Enzyms aus der Partikelfraktion	73
a) Anreicherung der Partikel	73
b) Isolation des Enzyms aus der gereinigten Partikelfraktion	76
2. Reinigung viraler Reverser Transkriptasen für Vergleichszwecke	78
3. Freiheit des gereinigten Partikelenzyms von Template	78
4. Abhängigkeit der Reverse Transkriptase-Reaktion von der Konzentration an zugesetztem Template-Primer-Komplex	79
5. Abhängigkeit der Reaktion von der Primerkonzentration	80
6. Abhängigkeit der Reaktion von der Enzymkonzentration und der Zeit	81
7. Spezifität der Homopolymer-abhängigen Reverse Transkriptase-Reaktion	83
8. Analyse der Reaktionsprodukte der Homopolymer-abhängigen Reverse Transkriptase-Reaktion durch Partikelenzym	83
9. Kontrolle auf Anwesenheit von Nukleasen in den Enzympräparationen	85

III. Identifikation des gereinigten Enzyms als Reverse Transkriptase	86
1. Untersuchung der Spezifität für bestimmte Homopolymere	86
2. Heteropolymere Reverse Transkription durch das Partikelenzym	89
a) Reaktionsbedingungen und Reaktionsverlauf	89
b) Untersuchung der chemischen Natur des synthetisierten Materials	92
c) Bestimmung der Größe des isolierten DNA-Produktes	93
c) Überprüfung der Spezifität der reversen Transkription von Globin mRNA durch Partikelenzym	94
IV. Untersuchungen zur biologischen Herkunft des Enzyms	106
1. Vergleich des Partikelenzym mit dem Enzym aus REV	106
2. Vergleich des Partikelenzym mit der Reversen Transkriptase der ASV/ALV-Gruppe	108
a) Immunologischer Vergleich	108
b) Vergleich der K_M -Werte von Partikelenzym und AMV-Enzym bezüglich dTTP und dGTP	116
c) Vergleich der thermischen Inaktivierungskinetiken	123
d) Vergleich der Empfindlichkeit gegen nicht-ionische Detergenzien	125
e) Vergleichende Optimierung der Reaktionsbedingungen für Partikelenzym und AMV-Enzym (Temperatur, pH, Mg^{++} -Konzentration, K^+ -Konzentration)	126
V. Inhibition und Stimulation der Enzymaktivität	130
1. Einfluß von Inhibitoren	130
a) Rifampicin	130
b) Actinomycin D	131
c) Parachloromercuribenzoessäure	133

2. Stimulierung der Reaktion durch Dimethylsulfoxid	134
E. DISKUSSION	135
F. LITERATUR	147
G. DANKSAGUNG	159

Lebenslauf

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß in der Allantoisflüssigkeit bebrüteter, virusfreier Hühnereier eine partikelgebundene Reverse Transkriptase als regelmäßiger Bestandteil auftritt.

Reinigung und Charakterisierung der Partikel werden beschrieben. Die Partikel können durch fehlende biologische Aktivitäten, Sedimentationsverhalten, Proteinzusammensetzung, Heterogenität in der Größe und das Fehlen einer endogenen Reaktion von den bekannten Hühner-RNA-Tumroviren, den Retikuloendothelioseviren (REV) und den Hühner-Leukose/Sarkomviren (ALV/ASV) abgegrenzt werden.

Aus den hochgereinigten Partikeln kann durch Affinitätschromatographie eine Reverse Transkriptase isoliert werden. Der Anreicherungsfaktor des isolierten Enzyms, gegenüber der Allantoisflüssigkeit liegt bei mindestens 50 000.

Partikelgebundenes und freies Enzym benötigen Template und Primer; sie können sowohl RNA-abhängige als auch DNA-abhängige DNA-Synthese katalysieren. Reaktionsbedingungen, Reaktionsverlauf und Inhibitoren der Reaktion werden ausführlich beschrieben. Durch das Muster der Präferenzen für bestimmte Homopolymere und durch die Fähigkeit, exakte DNA-Kopien heteropolymerer natürlicher RNA herzustellen, ist das Enzym als echte Reverse Transkriptase charakterisiert. Dadurch ist es eindeutig verschieden von den bisher bekannten DNA-Polymerasen der uninfizierten Hühnerzelle. Durch Vergleich des Enzyms mit den auf gleiche Art und Weise gereinigten Enzymen der beiden Gruppen von Hühner-RNA-Tumroviren (REV und ALV/ASV) kann gezeigt werden, daß es sich bei dem Partikelenzym nicht um das Genprodukt des Polymerasegens einer der beiden Virus-Gruppen handelt. Die Abgrenzung von dem REV-Enzym erfolgt durch Vergleich des Sedimentationsverhaltens und die Präferenz für Mg^{++} gegenüber Mn^{++} . Die Unterscheidung von dem Enzym der exogenen und endogenen ALV/ASV gelingt durch Anwendung des IgG-Neutralisationstestes, Studium der thermischen Inaktivierbarkeit, und der

Empfindlichkeit gegenüber Detergenzien, Bestimmung der K_M -Werte und vergleichende Optimierung der Reaktionsbedingungen. Damit ist erstmalig aus einem System, das weder exogen infiziert, noch transformiert ist, noch endogene Viren produziert, eine echte Reverse Transkriptase isoliert worden.

Die Bedeutung der Ergebnisse für das Verständnis des Systems Hühnerzelle - Tumorstoff und die Beziehung zur Protovirus-theorie werden diskutiert.

Abkürzungen

1) Viren:

ALV	Avian Leukosis Virus (Hühnerleukosevirus)
AMV	Avian Myeloblastosis Virus (Hühnermyeloblastosevirus)
ASV	Avian Sarcoma Virus (Hühnersarcomavirus)
BHT	Bryan High Titer Strain of Rous Sarcoma Virus
B 77	Bratislava Strain of Rous Sarcoma Virus
FeLV	Feline Leukemia Virus (Katzen-Leukämievirus)
Gibbon ape LSV	Gibbon Lymphosarcomavirus
MuLV	Murine Leukemia Virus (Mäuseleukämievirus)
ILV-UV	durch UV-Licht induziertes Leukosevirus
RAV-O	Rous associated virus (ein spontan auftreten- des endogenes Hühnerleukosevirus)
RSV	Rous Sarkomvirus
SR-RSV	Schmidt-Ruppin-Stamm des RSV
RAV-2	Rous associated virus-2
REV	Reticuloendotheliosevirus

2) Template-Primer-Komplexe:

p(C) (dG) ₁₂	Polycytidylsäure + basengepaarte Oligodeoxy- guanidylsäure
p(dC) (dG) ₁₂	Polydeoxycytidylsäure + Oligodeoxyguanidyl- säure

entsprechend sind die Abkürzungen p(A) (dT)₁₂ und p(dA) (dT)₁₂ zu verstehen.

3) Reagenzien:

TCA	Trichloressigsäure
SDS	Sodium Dodecylsulphate (Natriumlaurylsulphat)
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
NP 40	nicht-ionisches Detergenz
DMSO	Dimethylsulfoxid
³ H-dGTP	tritiiertes Deoxyguanosintriphosphat, ent- sprechend für dATP, dCTP, dTTP

dNTP	allgemein: Deoxynukleosidtriphosphat
dNMP	Deoxynukleosidmonophosphat (vor allem nach Einbau des Nukleotids in ein Polymer)

4) Einheiten

cpm	gemessene radioaktive Zerfälle/Minute
Upm	Umdrehungen pro Minute
S	Svedbergeinheit
pMol	Picomol (10^{-12} Mol)
mM	millimolar
μ M	mikromolar
g	Erdbeschleunigung, 9.81 g/sec^2

5) Sonstige

MW	Molekulargewicht
RNA	Ribonukleinsäure, international vereinbarte Abkürzung
DNA	Deoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementär-DNA
mRNA	messenger-RNA
IgG	Immunglobulin G

A. EINLEITUNG

I. Allgemeiner Teil

1. Reverse Transkription

Das Überschreiben einer in DNA festgelegten Sequenz in eine basenkomplementäre RNA ("Transkription") ist ein intensiv erforschter Vorgang. Ihre Bedeutung für die Genexpression wurde im Zentralen Dogma der Molekularbiologie (1) formuliert. Die Richtung der Überschreibung, nämlich von DNA zu RNA, wurde dabei zunächst für nicht umkehrbar gehalten. Untersuchungen von Fairman (2), Bather (3), Temin (4,5), Vigier und Goldé (6) und Bader (7,8) über die Replikation von RNA-Tumurviren und die durch einige Vertreter dieser Virusklasse ausgelöste Transformation von Zellen ergaben jedoch, daß bei beiden Vorgängen DNA eine Rolle spielt. Da es sich um RNA-haltige Viren handelt, war dies zunächst nicht erklärbar. Folgende Aussagen wurden aus den Experimenten gewonnen:

- a) Virusreplikation und virusbedingte Transformation lassen sich durch Hemmstoffe der DNA-abhängigen RNA-Polymerase hemmen;
- b) beide Vorgänge sind zu frühen Zeiten (8-12 Stunden) nach Infektion durch Hemmstoffe der DNA-Synthese zu hemmen, aber später durch diese nicht mehr beeinflussbar.
- c) Einwirkung von Hemmstoffen der Proteinsynthese zu frühen Zeiten des Infektionsvorganges können Replikation und Transformation nicht unterbinden.

Temin formulierte auf Grund dieser Befunde die Provirus-theorie (9). Sie besagt, daß die einzelsträngige RNA der RNA-Tumurviren durch eine rückläufige Transkription ("reverse Transkription") in DNA (= das "Provirus") überschrieben wird. Diese DNA wird in das Zellgenom eingebaut. Die Realisation der in der Virus RNA niedergelegten genetischen Information kann dann wie bei einem natürlichen zellulären Gen erfolgen. Da ein entsprechendes Enzym zur Überschreibung der RNA in DNA ("Reverse Transkriptase") in Zellen nicht bekannt war, konnte man vermuten, daß es sich dabei um ein virales Enzym handeln

müsse. Aus dem fehlenden Effekt der Proteinsyntheseinhibitoren zu Beginn des Infektionsvorganges (8) konnte man schließen, daß das Virus die benötigte Polymerase bereits mitbringt und nicht erst in der infizierten Zelle synthetisieren lassen muß.

Diese Aussage konnte 1970 durch Baltimore (10) und Temin & Mizutani (11) bestätigt werden. Sie zeigten, daß die von ihnen untersuchten Rous Sarkomviren und Rauscher Leukämieviren im Innern der Viruspartikel eine RNA-abhängige DNA-Polymerase besitzen, welche die virale RNA als Matrize benutzen kann ("endogene Reaktion"). In der folgenden Zeit wurden von zahlreichen Arbeitsgruppen Befunde erarbeitet, die zeigen, daß Reverse Transkriptase tatsächlich die Rolle spielt, die von Temin in der Provirushypothese formuliert worden war.

(Die umfassende Literatur über die Wirkungsweise des Enzyms wurde in zahlreichen Übersichtsarbeiten zusammengefaßt (12-15), der Nachweis, daß die Provirus-synthese tatsächlich von dem viralen Enzym durchgeführt wird, wurde in 16-20 erbracht.)

2. Eigenschaften der Reversen Transkriptase

Die bisher isolierten und charakterisierten Reversen Transkriptasen zeigen drei Teilaktivitäten (13, 21):

- I) RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität,
- II) RNase H-Aktivität ("Hybridase", eine Aktivität, die spezifisch den RNA-Anteil von RNA-DNA-Hybridmolekülen hydrolisiert),
- III) DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität.

Für die Teilaktivitäten I und III ist gezeigt, daß sie nur arbeiten können, wenn außer einer Matrize ("Template") ein basenkomplementäres Startermolekül ("Primer") mit einem freien 3'-OH-Ende und Deoxynukleosidtriphosphate als Substrat zur Verfügung stehen. Die Polymerisationsrichtung ist dabei von 5'-Ende zum 3'-Ende (22). Die Teilaktivität III kann durch Actinomycin D gehemmt werden (23,24).

Durch die Einführung synthetischer Homopolymerkomplexe (Template + Primer) konnte die Sensitivität der Aktivitätsmessung der Reversen Transkriptasen wesentlich erhöht werden (25,26). Die folgende Schemazeichnung I gibt einen Überblick über die drei verschiedenen Teilaktivitäten und zeigt die Möglichkeit, mithilfe von Homopolymerkomplexen Teilaktivität I bzw. III zu testen. Außerdem ist aus der Zeichnung ersichtlich, wie Globin-mRNA (+ (dT)₁₂) als Template zur Messung reverser Transkription heteropolymerer RNA verwendet werden kann.

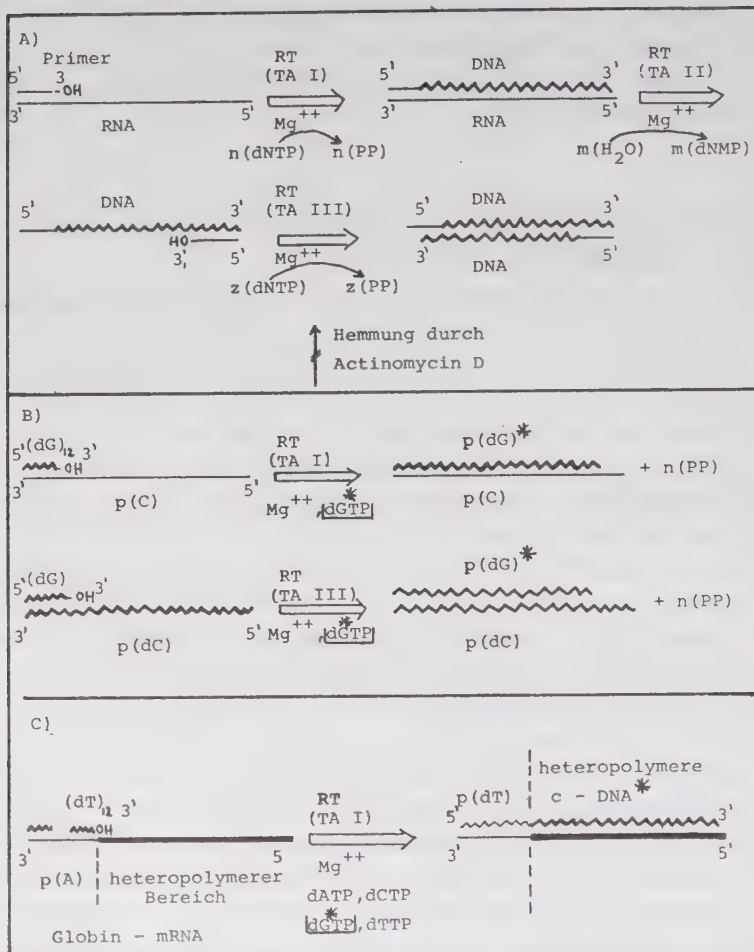
3. Abgrenzung Reverser Transkriptasen von den üblichen DNA-Polymerasen eukaryonten Zellen

Von den drei Teilaktivitäten einer Reversen Transkriptase ist die charakteristische Eigenschaft des Enzyms seine Fähigkeit, basenkomplementäre DNA-Kopien von natürlicher, heteropolymerer RNA zu synthetisieren (13,21,27,28,29,30). Keine der bisher bekannten zellulären eukaryonten DNA-Polymerasen kann diese Syntheseleistung vollbringen (31,32). RNA-abhängige DNA-Synthese, abhängig von natürlicher RNA ist deshalb das entscheidende Kriterium, ob es sich bei einem Enzym um eine echte Reverse Transkriptase handelt. Dabei muß überprüft werden, ob die Reaktion abhängig von Template und Primer abläuft, ob alle vier Deoxynukleosidtriphosphate benötigt werden, und ob tatsächlich ein RNA-DNA-Hybrid gebildet wird. Durch Anwesenheit von Actinomycin D im Reaktionsansatz kann dabei verhindert werden, daß unerkannte DNA-Verunreinigungen als Template benützt werden, und daß die RNA-abhängige Reaktion zu doppelsträngiger DNA führt. Nach Reinigung des Hybridmoleküls und Entfernen der ursprünglichen Template-RNA muß das DNA-Produkt rückhybridisierbar an erneut zugesetzte Template-RNA sein.

Eine RNase-Sensitivität der Polymerisationsreaktion allein zeigt nicht, daß es sich um RNA-abhängige DNA-Synthese handelt, da auch DNA-abhängige DNA-Synthese mit einem RNA-Primer RNase-sensitiv ist! (33,34,35).

Schemazeichnung I: Reverse Transkription

- Vereinfachte (und bezüglich Teilaktivität II hypothetische) Reaktionsfolge bei der reversen Transkription natürlicher RNA (mit RNA - Primermolekül).
- Aktivitätsmessung der RNA - abhängigen und der DNA - abhängigen DNA - Polymeraseaktivität unter Verwendung der Homopolymer-komplexe p(C) (dG)₁₂ und p(dC) (dG)₁₂.
- Reverse Transkription natürlicher, heteropolymerer RNA. Man beachte, daß bei Verwendung von markiertem dGTP nur die heteropolymere c - DNA markiert wird, und der homopolymere p(dT) - Bereich unmarkiert bleibt.



— = RNA, ~~~ = DNA, * = radioaktiv markiert, RT = Reverse Transkriptase; TA = Teilaktivität; dNTP = Deoxynukleosidtriphosphat; dnMP = Deoxynukleosidmonophosphat; PP = Pyrophosphat;

Synthetische Homopolymerkomplexe erlauben im Reverse Transkriptasetest höhere DNA-Syntheseleistungen als natürliche RNA (13). Sie eignen sich vor allem dazu, Reverse Transkriptase zu entdecken, vorläufig zu charakterisieren und ermöglichen Experimente mit kleinen Enzymkonzentrationen. Es muß aber beachtet werden, daß auch zelluläre DNA-Polymerasen Homopolymere verwenden (31). Doch lassen sich Reverse Transkriptasen von den üblichen zellulären DNA-Polymerasen durch das Muster der Präferenzen für Ribohomopolymere und Deoxyribohomopolymere unterscheiden (30,36,37,38, 39).

Wie Tabelle I zeigt, kann Polymerase α weder heteropolymere noch homopolymere RNA-Stränge als Template benutzen. Polymerase β kann in Abhängigkeit von $p(A)(dT)_{12}$ $p(dT)$ synthetisieren, bevorzugt jedoch $p(dA)(dT)_{12}$ gegenüber $p(A)(dT)_{12}$. Polymerase γ verwendet $p(A)(dT)_{12}$ wesentlich effektiver als $p(dA)(dT)_{12}$, kann jedoch ebenso wie Polymerase β keine Synthese abhängig von $p(C)(dG)_{12}$ durchführen. Reverse Transkriptasen gleichen in ihrer deutlichen Präferenz für $p(A)(dT)_{12}$ gegenüber $p(dA)(dT)_{12}$ der Polymerase γ , zeichnen sich jedoch durch effektive Verwendung des Komplexes $p(C)(dG)_{12}$ aus (26,29,30,32,36,37,40,41). Die starke Präferenz für das Ribohomopolymer gegenüber dem Deoxyribohomopolymer, wie es sich in dem Verhältnis der effektiven Verwendung von $p(A)(dT)_{12}$ zu $p(dA)(dT)_{12}$ ausdrückt, findet sich in dem Verhältnis $p(C)(dG)_{12}$ zu $p(dC)(dG)_{12}$ nicht (26). Daraus folgt, daß $p(dC)(dG)_{12}$ als Template-Primer-Komplex zur Messung der DNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität der reversen Transkriptasen gut geeignet ist.

Bei der vorläufigen Charakterisierung eines Enzyms durch Homopolymerkomplexe muß natürlich durch entsprechende Kontrollversuche sichergestellt sein, daß das untersuchte Enzym mit Template oder Primer allein keine Aktivität zeigt. Damit ist das Enzym gegenüber einer terminalen Deoxynukleotidyltransferase abgegrenzt.

Tabelle I: Verwendung synthetischer Homopolymer-Komplexe durch zelluläre und virale Polymerasen

angebotene Vorstufe:	dTTP		dGTP			
Homopolymerkomplex:	p(dA) (dT) ₁₂	p(A) (dT) ₁₂	$\frac{p(A) (dT)_{12}}{p(dA) (dT)_{12}}$	p(dC) (dG) ₁₂	p(C) (dG) ₁₂	glob. mRNA + (dT) ₁₂
Polymerase α	++	-	-	n.g.	-	-
Polymerase β	+++	++	<1	n.g.	-	-
Polymerase γ	+	+++	>1	n.g.	-	-
Reverse Transkriptase	(+)	+++	>1	+++	++++	+

Die Skala reicht von - (= keine Aktivität) über (+) (= sehr schwache Aktivität) bis zu +++++ (= sehr hohe Aktivität). n.g. = nicht getestet. Die Spalte 3 gibt das Verhältnis der Aktivitäten wieder, die mit den Komplexen p(A)-(dT)₁₂ bzw. p(dA)(dT)₁₂ erhalten werden. Die Angaben wurden aus folgenden Literaturstellen entnommen: 26, 31, 36, 37, 38, 39.

Die in Tabelle I aufgezeigten Template-Primer-Präferenzen sind für das Hühnersystem erarbeitet worden. Sie gelten jedoch in den wesentlichen Punkten auch für andere Systeme. Die bisherigen Aussagen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen: Synthetische Template-Primer-Komplexe eignen sich sehr gut zum Aufspüren Reverser Transkriptasen und zur Abgrenzung gegenüber bekannten DNA-Polymerasen. Die endgültige Beurteilung, ob es sich bei einem Enzym um eine echte Reverse Transkriptase handelt, muß jedoch davon abhängen, ob das Enzym exakte DNA-Kopien natürlicher RNA synthetisieren kann.

Die Template-Primer-Charakteristika echter Reverser Transkriptasen sind in der folgenden Übersicht zusammengestellt:

Übersicht über die Template-Primer-Charakteristika echter Reverser Transkriptase:

- 1) Keine Aktivität mit Template oder Primer allein (Abgrenzung gegenüber terminaler Deoxynukleotidyltransferase).
- 2) Starke Bevorzugung von $p(A)(dT)_{12}$ gegenüber $p(dA)(dT)_{12}$.
- 3) Effektive Verwendung von $p(C)(dG)_{12}$ und $p(dC)(dG)_{12}$.
- 4) Spezifische Reverse Transkription heteropolymerer RNA.

4. Auftreten Reverser Transkriptase

a) Reverse Transkriptase in Viren, virus-infiziertem und transformiertem Gewebe

Reverse Transkriptase wurde bisher in allen daraufhin untersuchten Gruppen von RNA-Tumroviren (B- und C-Typ-Viren, Viren vom Typ des Mazon Pfizer Monkey Virus) nachgewiesen (13). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß A-Typ-Partikel

Reverse Transkriptase besitzen (43,44). Bei den A-Typ-Partikeln handelt es sich vermutlich um Verwandte oder Vorstufen von B- und C-Typ-Viren (44). Einige nicht-onkogene Viren, die degenerative Erkrankungen des Nervensystems hervorrufen besitzen ebenfalls Reverse Transkriptase (45,46,13). Außerdem wurde Reverse Transkriptase in einem aus Gewebekulturen isolierten Virus mit cytopathischer Wirkung gefunden (47,13). Tumovirus-infiziertes Gewebe enthält, wie zu erwarten, Reverse Transkriptase (36,48). Aus, unter natürlichen Bedingungen transformierten Zellen, nämlich menschlichen Leukämiezellen, gelang es in einigen Fällen, Reverse Transkriptase zu isolieren (42,49). Bei der Untersuchung der Leukämiezellen zahlreicher Patienten fand sich in den meisten Fällen zwar ein Komplex mit endogener RNase-sensitiver DNA-Polymeraseaktivität, aber nur in 20% der Fälle konnte daraus ein Enzym isoliert werden, das auch in vitro echte Reverse Transkriptaseaktivität zeigte. Bei den restlichen Fällen endete die Aufarbeitung mit einem Enzym, das in vitro die Eigenschaften der Polymerase γ zeigte oder mit keinem unter den gewählten Bedingungen faßbaren Enzym (R.C. Gallo, persönliche Mitteilung).

b) Reverse Transkriptase in virusfreiem und nicht-transformiertem Gewebe?

Eine Reihe von Publikationen berichtet über das Auftreten Reverser Transkriptase in virusfreiem Gewebe (50-57). Es handelt sich dabei um Fehlinterpretationen unvollständiger Daten, da nur mit dem Template-Primer-Komplex p(A)-(dT)₁₂ gearbeitet wurde, der auch von zellulären normalen DNA-Polymerasen verwendet werden kann. Diese Tatsache war noch nicht bekannt, als diese Experimente (50-57) durchgeführt wurden. Aufgrund späterer Ergebnisse muß angenommen werden, daß Polymerase B (und) oder Polymerase γ für die gemessene Aktivität verantwortlich waren.

Für eine endogene, RNase-sensitive DNA-Polymeraseaktivität aus stimulierten Lymphocyten, die möglicherweise durch Reverse Transkriptase hätte hervorgerufen werden können, wurde gezeigt, daß das Enzym nach der Reinigung keine für Reverse Transkriptase typische Template-Charakteristik aufwies (33). Spätere Untersuchungen ergaben, daß es sich um DNA-abhängige DNA-Synthese mit einem RNA-Primer handelte (34).

Aus den Placenten von Rhesusaffen konnte ein Enzym isoliert werden, das allen Kriterien einer echten Reversen Transkriptase standhielt (58,59), allerdings handelte es sich dabei um die Reverse Transkriptase eines in Placenten spontan auftretenden endogenen Virus. Es kann somit nicht mehr von einem virusfreien System gesprochen werden.

Die einzige Ausnahme stellt ein Befund von Kang und Temin dar (60,61). Sie fanden in uninfizierten Hühnerzellen einen Komplex mit endogener RNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität. Die synthetisierte DNA konnte an RNA aus dem gleichen Komplex rückhybridisiert werden. Allerdings gelang es nicht, aus der aktiven Fraktion eine Reverse Transkriptase zu isolieren. Kang und Temin gewannen ein Enzym, das die Eigenschaften der Polymerase β zeigte. Untersuchungen einer weiteren Arbeitsgruppe führten ebenfalls zu dem Schluß, daß aus uninfizierten Hühnerzellen keine Reverse Transkriptase zu isolieren sei (36).

Das Fehlschlagen der Versuche, Reverse Transkriptase aus Normalgewebe zu isolieren und das regelmäßige Auftreten des Enzyms in Tumurviren oder tumorvirusinfiziertem Gewebe führten dazu, daß Reverse Transkriptase als Leitenzym für RNA-Tumurviren (und verwandte Viren) betrachtet wurde. Ein virusfreies System sollte demnach auch frei von Reverser Transkriptase sein. Umgekehrt sollte sich aus dem Nachweis einer echten Reversen Transkriptase auf die Anwesenheit oder die Replikation von RNA-Tumurviren schließen lassen. Daraus wurden unter anderem auch diagnostische Hoffnungen geschöpft.

5. Die Protovirustheorie

Obwohl keine Reverse Transkriptase aus virusfreien Systemen isoliert werden konnte, formulierte Temin die Protovirustheorie (62), die postuliert, daß reverse Transkription eine physiologische Rolle spielt. Durch reverse Transkription von Messenger-RNA und durch Transport der synthetisierten DNA von Zelle zu Zelle, und innerhalb der Zelle zurück zum Kern, und anschließenden Einbau in das Genom, könnte sich eine Möglichkeit zur Genamplifikation und zur Variation der Information ergeben. Diese physiologische reverse Transkription sollte demnach eine Rolle vor allem bei Differenzierungsvorgängen spielen. Die maligne Entartung einer Zelle wäre aus dieser Sicht nur ein "unbeabsichtigter" und "böartiger" Nebeneffekt, und bei den RNA-Tumurviren würde es sich um verselbständigte genetische Elemente handeln, welche speziell die Fähigkeit zur malignen Transformation erworben haben.

Während sich die Provirustheorie (siehe Einleitung) speziell mit der reversen Transkription der RNA bestimmter Viren beschäftigt, bezieht sich die Protovirustheorie auf reverse Transkription allgemein. Die Protovirustheorie wird von Temin selbst als Spekulation ausgewiesen (62). Falls sie zutrifft, sollte in Zellen (zumindest bestimmter Differenzierungsstufen) Reverse Transkriptase anzutreffen sein. Diese zelluläre Reverse Transkriptase könnte, aber muß nicht, verschieden von der Reversen Transkriptase der endogenen Viren sein.

II. Spezieller Teil: Das System Hühnerzelle - Tumovirus

1. Die Hühner-RNA-Tumoviren

Es handelt sich dabei um das am längsten bekannte und am meisten bearbeitete System der experimentellen Tumovirologie. Man kennt zwei Gruppen von Hühner-RNA-Tumoviren, nämlich die Retikuloendothelioseviren (REV) und die Hühner-Leukose-Sarkom-Viren (ALV/ASV) (64,14). Beiden ist der komplexe Aufbau aus Core und Hülle gemeinsam. Im Core ist eine einzelsträngige RNA zu finden, die mit 70 S sedimentiert und nach Erhitzen in kleinere Komponenten (35 S) zerlegt wird. Beide Virusgruppen haben eine Dichte um ca. 1.16 g/cm^3 , die typisch für die RNA-Tumoviren ist, jedoch auch bei anderen polymerasetragenden zellulären Ausschlüssen gefunden wird (35).

Die beiden Virusgruppen unterscheiden sich in ihrer Proteinzusammensetzung (65), die aber innerhalb der Gruppen identisch ist (64,66). Bei den Viren der REV-Gruppe handelt es sich um typische exogene Viren. Weniger als 5% ihrer genetischen Information ist in der DNA uninfizierter Hühnerzellen zu finden (67).

Die ALV/ASV kommen sowohl als exogene als auch als endogene Viren vor (14). Ihre RNA besteht aus zwei identischen Untereinheiten (71). Auf den Untereinheiten wurden drei (ALV), bzw. vier (ASV) Gene lokalisiert:

- gag (gruppenspezifische Antigene. Strukturkomponenten des Cores, gag codiert für ein Precursor-Molekül)
- pol (Polymerase, d.h. Reverse Transkriptase)
- env (Envelope-Protein. Glykoprotein das für die Spezifität bei der Infektion verantwortlich ist)
- sarc (Viren, die dieses Gen tragen können Sarcome hervorrufen und Fibroblasten in Gewebekultur transformieren).

Die Reihenfolge dieser Gene auf der viralen 70 S Nukleinsäure wurde als 5'gag-pol-env-sarc 3' bestimmt (72). Die Information "sarc" befindet sich nur auf der Nukleinsäure

von Viren, die solide Tumoren erzeugen und Fibroblasten in Gewebekultur transformieren können ("Sarkomviren"). Die sogenannten "Leukoseviren" besitzen diese Information nicht, können jedoch Zellen des Hämopoetischen Systems transformieren, und dadurch Leukämien hervorrufen.

Die Einteilung der Hühnerleukose-Sarkomviren in die Untergruppen A - E erfolgt aufgrund der genetisch kontrollierten Resistenz von Hühnerzellen gegen die verschiedenen Typen. Infektion kann nur erfolgen, wenn ein Glykoprotein auf der Virusoberfläche (typspezifisches Antigen) und ein dazu passender Rezeptor auf der Zelloberfläche zusammentreffen. Viren mit einem Defekt in dem für das Glykoprotein verantwortlichen Gen "env" können durch gleichzeitige Infektion der Zelle mit einem Virus mit nichtdefektem "env" komplementiert werden. Man spricht von Helferaktivität. Wird eine Zellpopulation mit Virus einer bestimmten Untergruppe infiziert, so kann eine spätere zusätzliche Infektion mit Virus der gleichen Untergruppe nicht stattfinden, da die Rezeptoren besetzt sind ("Interferenz"). Experimente zur Darstellung von Helferaktivität und Interferenz lassen sich am besten mit biologisch unterscheidbaren Viren (z.B. Leukose und Sarkomviren) durchführen. Test auf Helferaktivität und Interferenz sind sehr gut dazu geeignet, Leukoseviren aufzuspüren und werden zum Nachweis von kontaminierenden Leukoseviren in biologischem Material verwendet.

2. Die Reverse Transkriptase der Retikuloendothelioseviren

Die Reverse Transkriptase der REV besteht aus einem Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 70 000 - 80 000 Dalton (68,69). Dieses Protein ändert Konformation und immunologische Eigenschaften in Abhängigkeit von der Salzkonzentration (70). Die in Puffer mit 0.5 M KCl gelöste Form zeigt immunologische Kreuzreaktion mit der Polymerase der ALV/ASV, während dies für die in Puffer + 0.01 M KCl gelöste Form nicht zutrifft.

3. Die Reverse Transkriptase der Viren der ALV/ASV-Gruppe

Die Reverse Transkriptase der ALV/ASV besteht aus zwei Untereinheiten, α (MW 70 000) und β (MW 110 000) (74). Isoliertes α besitzt alle drei Teilaktivitäten (75,76), für β ist keine Aktivität nachgewiesen worden. Jedoch enthält β alle Spaltpeptide, die auch in α enthalten sind (77). Für α ist gezeigt, daß es von der viralen Nukleinsäure codiert wird (76). Die Reversen Transkriptasen aller Viren der ALV/ASV-Gruppe sind immunologisch identisch. IgG, das gegen die Polymerase eines Vertreters dieser Gruppe gerichtet ist, hemmt die Polymerasen aller anderen Mitglieder der Gruppe identisch (78,79). Dies gilt auch für die Polymerase der endogenen Viren (79). Damit ist die Identität des Polymerasegens der exogenen Viren mit dem Polymerasegen der endogenen Viren gezeigt.

4. Die DNA-Polymerasen der uninfizierten Hühnerzelle

Wie bei anderen Eukaryonten lassen sich auch hier drei verschiedene DNA-Polymerasen nachweisen (α, β, γ) (31,36, 37,38). Die Templatecharakteristik die sehr gut zur Unterscheidung der Enzyme von Reverser Transkriptase dienen kann, wurde bereits besprochen (siehe Seite 9). Bei den Berichten über eine Hybrid-abhängige DNA-Polymerase und über RNA-abhängige DNA-Polymerasen (52,53,57) handelt es sich um Enzyme, die das unspezifische Template Polyadenylsäure revers transkribieren können, vermutlich wurde dabei Polymerase β gemessen (38). Bei der Suche nach Reverser Transkriptase in uninfizierten Zellen fand Weissbach keinen Hinweis auf das Vorkommen einer solchen Aktivität (36), während Temin einen Komplex mit endogener RNA-abhängiger DNA-Polymeraseaktivität fand (60). Das daraus isolierte Enzym glich jedoch Polymerase β und zeigte in vitro keine RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität.

5. Anwesenheit viraler Sequenzen in der DNA uninfizierter Hühnerzellen

"Uninfiziert" heißt in diesem Zusammenhang, daß in der Gegenwart keine Infektion stattfand und daß die Zellen keine Viren produzieren. Die Zellen besitzen jedoch Sequenzen in ihrer DNA, die der Sequenz der RNA der ALV/ASV gleichen. Während Neimann mithilfe von RNA-DNA-Hybridisierungen nur die Leukosevirus-spezifischen Sequenzen in der zellulären DNA fand (80), konnte Stehelin durch DNA-DNA-Hybridisierung auch das Auftreten der Sarkomvirus-spezifischen Sequenz "sarc" nachweisen (81).

Die Anwesenheit der kompletten Gene für "gag", "env" und "pol" in der DNA uninfizierter Hühnerzellen wird dadurch deutlich gemacht, daß bestimmte Hühnerzell-Linien spontan ein endogenes Virus (RAV - O) freisetzen (82), und daß es gelingt, durch chemische Behandlung oder durch Bestrahlung die Synthese endogener Viren in uninfizierten Zellen zu induzieren (83). Diese endogenen Viren besitzen die für die ALV/ASV-Gruppe typischen Proteine und 70 S-RNA (83). Sowohl für die spontan auftretenden endogenen Viren, als auch für die induzierten endogenen Viren wurde gezeigt, daß sie eine Reverse Transkriptase besitzen, die identisch mit der Reversen Transkriptase der Viren der ALV/ASV-Gruppe ist (79). Damit ist die Identität des Genes "pol" auf der RNA der ALV/ASV mit dem Gen "pol" der DNA uninfizierter Hühnerzellen gezeigt.

Bisher gelang es noch nicht, ein endogenes Sarkomvirus zu aktivieren. Für die spontan auftretenden und die induzierten endogenen "Leukoseviren" ist noch in keinem Fall nachgewiesen worden, daß Leukämien durch diese Viren ausgelöst werden können.

6. Expression virusspezifischer Gene in uninfizierten Zellen

Die Gene "env" und "gag" werden in den Zellen vieler Hühnerstämme exprimiert (83 - 90). Die Synthese der virusspezifischen Proteine führt dabei weder zu einer Virusproduktion noch zu einer Transformation der Zellen.

Wird eine Zelle, in der "env" exprimiert ist, mit einem exogenen Virus mit Defekt im Gen "env" infiziert, so kann Komplementation erfolgen. Die freigesetzten (infektiösen) Viren tragen in ihrer Hülle Glykoproteine, die vom zellulären "env"-Gen kodiert wurden. Die Viren besitzen damit den Wirtsbereich E. Diese Komplementationsleistung der Zelle wurde als "chicken helper factor" (chf) bezeichnet. Das zugrunde liegende Strukturgen ist "env", die Regulation der Aktivität dieses Genes wird durch ein Regulatorgen bewirkt, das in den alternativen Zuständen chf^+ und chf^- vorliegen kann.

Die Expression des Genes "pol" in nicht-virusproduzierenden Zellen ist bisher nicht nachgewiesen worden (36). Dies steht in guter Übereinstimmung mit der Tatsache, daß exogene Viren mit einem Defekt in ihrem "pol"-Gen in uninfizierten Hühnerzellen nicht komplementiert werden (17,19).

Für virologische und medizinische Zwecke (Impfstoffherstellung) werden heute Hühnerherden gehalten, die frei von exogenen oder aktivierten endogenen Leukoseviren sind, und die zumindest teilweise (im Idealfall vollständig) dem Genotyp gs^- (= gag^-) chf^- angehören, d.h. arm an virusspezifischen Proteinen sind.

III. Problemstellung

Vorversuche hatten ergeben, daß in der Allantoisflüssigkeit bebrüteter leukosevirus-freier Hühnereier sedimentierbare DNA-Polymeraseaktivitäten zu finden waren. Die Verwendung verschiedener synthetischer Template-Primer-Komplexe führte zu Ergebnissen, die es wahrscheinlich machten, daß ein, zumindest Reverse-Transkriptase-ähnliches Enzym an sedimentierbare Strukturen gebunden war. Bei dem Wissensstand über das Hühnersystem sollte dies nur erklärbar sein, wenn Infektion durch exogene RNA-Tumoviren, oder eine teilweise oder vollständige Expression endogener Viren vorlag. Folgende Fragen wurden gestellt und in dieser Arbeit beantwortet:

- 1) Handelt es sich bei den gefundenen Strukturen um Mitglieder einer der beiden Gruppen von Hühner-RNA-Tumoviren?
- 2) Handelt es sich bei dem Enzym um eine echte Reverse Transkriptase?
- 3) Handelt es sich bei dem Enzym um das Genprodukt des Polymerasesgens einer der beiden Virusgruppen?
- 4) Handelt es sich um zufällig auftretende Strukturen oder um regelmäßig zu findende Bestandteile des bebrüteten Hühnereis?

B. MATERIAL

Leukosevirus-freie Eier stammten von Lohmann (Cuxhaven) und SPAFAS Inc., Connecticut, USA.

Allantoisflüssigkeit von Eiern einer SPAFAS-Ablegerherde mit dem Genotyp gs₋chf wurde von Prof. Duesberg (Berkeley, USA) zur Verfügung gestellt.

Außerdem wurden Eier aus der Geflügelzucht Hölzl (Moosburg, Oberbayern) verwendet.

AMV-haltiges Hühnerplasma wurde von Prof. J. Beard (St. Petersburg, USA) zur Verfügung gestellt.

Gereinigtes REV war ein Geschenk von Dr. K. Moelling und Prof. R. R. Friis (Universität Giessen).

Gereinigtes IgG gegen AMV-Reverse Transkriptase und gereinigtes IgG des Tieres (Ratte) vor der Immunisierung stammte aus den Laboratorien von Prof. Gallo (Bethesda, USA) und Prof. Spiegelman (New York).

Sl-Nuklease war ein Geschenk von Dr. B. van Dorp, gereinigte ribosomale RNA aus Hühnermyeloblasten ein Geschenk von Dr. B. Martin.

Radioaktiv markierte Deoxynukleosidtriphosphate stammten von Amersham/Buchler oder Schwarz/Mann.

p(A) (dT)₁₂ und p(C) stammten von Boehringer, Mannheim, ebenso alle unmarkierten Deoxynukleosidtriphosphate.

p(C) (dG)₁₂, (dG)₁₂, p(dC) (dG)₁₂, p(dA) (dT)₁₂, (dT)₁₂ stammten von P.L. Biochemicals, Milwaukee, USA. Die Homopolymere wurden in lyophilisierter Form bei 4°C gelagert. Nach dem Lösen in Wasser wurden sie in kleinen Aliquots bei -20°C aufbewahrt. Nach dem Auftauen nicht verwendetes Material wurde nicht wieder eingefroren, sondern verworfen.

Gelöstes p(C) (dG)₁₂ und p(dC) (dG)₁₂ wurden vor Einsetzen in den Reaktionsansatz für 7 Minuten bei 80°C erwärmt und langsam abkühlen lassen.

BSA (A grade) stammte von Calbiochem.

Das verwendete Rifampicinderivat stammte von Lepetit, Mailand und war ein Geschenk von Prof. Gallo.

DNase I stammte von Worthington, RNase A von Boehringer.

Globin mRNA war ein Produkt von Searle.

C. METHODEN

1. Standard-Reaktionsansatz zur Messung der Aktivität Reverser Transkriptase.

In einem Volumen von 100 μ l (Einfachansatz) befanden sich folgende Zusätze (in Klammern jeweils Endkonzentration): Magnesium-Acetat (10 mM), Kaliumchlorid (20-80 mM), Tris-HCl, pH 8.3 (50 mM), Dithiotreitol (10 mM), Adenosintriphosphat (1 mM). Der Ansatz enthielt 1 μ g Template-Primer-Komplex und 5 μ Ci radioaktiv markiertes Deoxynukleosidtriphosphat (in der Regel 8 Ci/mMol). 50 μ g Rinderserumalbumin/100 μ l dienten zur Stabilisierung des Enzyms. Wenn die reverse Transkription heteropolymerer RNA gemessen wurde, enthielt der Ansatz die zusätzlichen unmarkierten Deoxynukleosidtriphosphate in einer Endkonzentration von 0.6 mM. Wenn Partikel oder intakte Viren in den Test eingesetzt wurden, enthielt er zusätzlich 0.1% (vol/vol) NP 40. Der Reaktionsansatz wurde bei 37°C für die gewünschte Zeit inkubiert. Zur Bestimmung der in säureunlösliches Material eingebauten Radioaktivität wurde der gesamte Testansatz oder ein Aliquot davon nach Zugabe von BSA auf eine jeweilige Endmenge von 100 μ g/Meßwert, auf 10% TCA gebracht. Die TCA-Lösung enthielt 1% Pyrophosphat. Nach dem Stehenlassen bei 0-4°C für wenigstens 15 Minuten wurde die Probe durch Millipore Nitrocellulosefilter (Porengröße 0.6 μ) filtriert, mit wenigstens 30 ml 5%iger TCA (+ 1% Pyrophosphat) nachgewaschen und das Filter bei 60 °C getrocknet. Es konnte dann in einem Szintillationsreagenz (auf Toluolbasis) die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt werden.

2. Reinigung der Partikel:

Befruchtete Hühnereier wurden für 10 Tage bei 37°C und etwa 60% Luftfeuchtigkeit bebrütet. Der Brutautomat sorgte dabei für eine Drehung der Eier um die Längsachse etwa in Abständen von 4 Stunden. Die Eier wurden anschließend über Nacht

bei 4°C gelagert. Anschließend wurde mit Hilfe einer speziellen Lampe die Luftblasenbegrenzung auf das Ei gezeichnet. Bei diesem Schritt konnten Eier ohne Embryo oder durch Bakterien infizierte Eier ausgesondert werden. Nun wurde die Oberfläche kurz mit 70% Alkohol gewaschen und dann die Schale über der Luftblase entfernt. Nach Durchstossen der nun sichtbaren Haut gelangt man direkt in die Allantoishöhle. Die Allantoisflüssigkeit wurde durch eine Spritze abgesaugt. Man kann dabei Ausbeuten von 4-10 ml Flüssigkeit/Ei erwarten. Die gesammelte Allantoisflüssigkeit wurde zunächst durch einige Lagen Gaze filtriert und anschließend niedertourig zentrifugiert, um Zellen und Zelldebris abzutrennen. Es eignet sich dazu jede Zentrifuge, die größere Volumen aufnehmen kann und wenigstens 2000 g leistet.

Nach diesem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand einer Ultrazentrifugation unterzogen. Zur Pelletierung eignet sich dabei der Rotor 30 (Festwinkelrotor). Das Material wurde für 45 Minuten bei 4°C mit 27 000 Upm zentrifugiert. Nach dem Lauf wurde der Überstand verworfen, und das Röhrchen konnte für weitere Läufe verwendet werden. Sollte das Material schonender gewonnen werden, so wurde es auf ein 50% Kissen im Rotor SW 27 zentrifugiert (26 000 Upm, 4°C, 90 Minuten). (Da das pro Lauf bewältigte Volumen geringer ist als bei Verwendung des Festwinkelrotors und die Laufzeit länger sein muß, ist diese alternative Präparationsmethode sehr zeitintensiv, führt jedoch zu etwas höheren Ausbeuten.) Das auf das Kissen sedimentierte oder das im Festwinkelrotor pelletierte Material wurde nun in STE resuspendiert. Nicht zu resuspendierendes Material wurde durch niedertourige Zentrifugation abgetrennt und verworfen. Es folgte Zentrifugation der Partikel durch eine 20%ige Rohrzuckerschicht auf ein 50%iges Kissen (SW 27 oder 27.1, 20% Rohrzuckerschicht

sollte etwa ein Drittel des Röhrchenvolumens ausmachen, 26 000 Upm, 4°C, wenigstens 3 Stunden). Das Material über der 50%igen Rohrzuckerschicht wurde entnommen und weitergereinigt. Als nächste Schritte folgen die in der Legende zu Figur 1 bzw. 2 beschriebenen Sedimentations- und Dichtegradienten. Das aus dem Dichtegradienten entnommene Material eignete sich sehr gut zur Isolation des Enzyms.

3. Gewinnung und Reinigung von AMV

Als Ausgangsmaterial diente das Plasma von Küken mit akuter myeloischer Leukämie. Es wurde zum größten Teil von Prof. J. Beard, St. Petersburg, USA zur Verfügung gestellt, zum kleineren Teil durch Herzpunktion von Küken, die etwa 10 Tage vorher mit AMV i.p. infiziert worden waren, selbst gewonnen. Nach einer niedertourigen Zentrifugation zum Abtrennen der Zellen wurde der Überstand auf ein 50% Rohrzucker-Kissen im Rotor SW 27 überschichtet und für 60 Minuten bei 26 000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, und bei Bedarf wurde auf das gleiche Kissen wiederholt zentrifugiert. Die deutlich sichtbare Schicht über der 50%igen Saccharose wurde dann abgenommen und das Virus durch Stufengradienten und Dichtegradienten weitergereinigt. Es können hierfür die gleichen Bedingungen wie für die Reinigung des Partikels beschrieben, verwendet werden. Alle Geräte, die mit Virus in Kontakt gekommen waren, wurden autoklaviert. Nicht zu autoklavieren des Material (z.B. explosive Nitrocellulose-Röhrchen) wurden in 70% Alkohol eingelegt.

4. Radioaktivitätsmessungen

Als Szintillationsreagenz diente eine Lösung aus:

1 l Toluol

5 g 2,5-Diphenyloxazol

0.3 g 2,2-Phenyl-bis-(4-Methyl)-5-Phenyloxazol

Die Probe (auf Nitrocellulosefilter, mit einer Schicht von 100 µg BSA, die von der Fällung stammten) wurde in 10 ml Szintillationsreagenz gegeben und die zu messenden Impulse/Zeit wurden in einem Szintillationsspektrophotometer vom Typ "Nuclear Chicago" bestimmt. Eichmessungen ergaben, daß 1 µCi Radioaktivität 620 000 cpm (counts per minute) gleichzusetzen war. Es wurden also 28% der theoretisch auftretenden Zerfälle bei der Zählung erfaßt.

5. Proteinbestimmung

Es wurde die Methode von Lowry et al. (91) verwendet. Folgende Lösungen wurden als Stammlösungen bei 4°C aufbewahrt:

Lösung A: 4 g NaOH
20 g Na_2CO_3
0.2 g K-Na-Tartrat
ad 1 ml

Lösung B: 0.5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
ad 100 ml H_2O

Folin-Phenolreagenz

Unmittelbar vor dem Test wurden 12.25 ml Lösung A und 0.25 ml Lösung B gemischt. Zum Standardansatz kamen davon 1 ml und 0.1 ml der proteinhaltigen Probe. Nach 20 Minuten bei Raumtemperatur wurden 0.1 ml 1:1 verdünntes Folin-Phenolreagenz zugegeben und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde bei 750 nm gegen eine gleichbehandelte Blindprobe (Wasser oder Puffer anstatt Protein) gemessen. Dieser Standardansatz lieferte im Bereich von 0.005 mg bis 0.08 mg pro Ansatz genau zu bestimmende Meßwerte, die direkt zur Konzentration proportional waren. Durch Verkleinerung des Reaktionsvolumens (30 µl Probe, 320 µl Mischung A+B, 35 µl Folinreagenz 1:1) konnte die Nachweisgrenze nach unten verschoben werden.

6. Reinigung Reverser Transkriptase durch Affinitätschromatographie an p(C)-Sepharose

Es wurde die von Marcus et al. (92) beschriebene Methode übernommen.

a) Herstellen der p(C)-Sepharose.

Benötigte Substanzen: Sepharosè 4 B (Pharmacia)
Polycytidylsäure (10 mg/ml in
50 mM Phosphatpuffer, pH 8.0)
50 mM K-Phosphatpuffer, pH 8.0
6 M NaOH
Bromcyan (sehr giftig!)
dest. H₂O

Präparation: 25 ml abgesetzte Sepharose wurden mit 25 ml Wasser gemischt und auf 10°C gekühlt. Alle weiteren Präparationsschritte erfolgten bei dieser Temperatur und unter einem gut funktionierenden Abzug. Durch Zugabe von NaOH wurde ein pH von 11 eingestellt und 5 g Bromcyan (im Mörser zerrieben) zugegeben. Der Beginn der Aktivierungsreaktion zeigte sich durch eine Abnahme des pH. Durch Zugabe von 6 M NaOH wurde der pH-Wert immer wieder zurück auf pH 11 gestellt. Eine Schwankung des pH-Wertes um maximal 0.5 pH-Einheiten (bei manueller Zugabe) schien dabei der Reaktion nicht abträglich zu sein. Nach 30-45 Minuten verlangsamte sich die Reaktion und die Sepharose wurde schnell mit 20 Volumina Phosphatpuffer gewaschen und zu der feuchten Sepharose die gelöste Polycytidylsäure gegeben und gemischt. Nach vorsichtigem Umrühren oder Schütteln über Nacht wurde das Material mit 200 Volumina kaltem dest. H₂O und 200 Volumina Phosphatpuffer gewaschen.

b) Durchführung der Affinitätschromatographie

Benötigte Lösungen:

Aufschlußpuffer: 0.15 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.8,
0.01 M EDTA, 10% (vol/vol) NP 40,
1% (w/vol) Natriumdesoxycholat,
0.4 M KCl, 20% (vol/vol) Glycerin.

Puffer A: 0.01 M K-Phosphat, pH 8.0, 0.001 M DTT,
10% (vol/vol) Glycerin.

Elutionspuffer: Puffer A, zusätzlich 0.4 M KCl

Als Säule diente eine Pasteurpipette. Das Säulenvolumen betrug zwischen 0.8 und 1.2 ml. Um der Sepharose Halt zu geben, wurde die Verengung der Pipette mit Glaswolle gefüllt. Die ganze Aufarbeitung fand in der Kälte statt. Pelletierte Partikel oder Viren wurden mit Aufschlußpuffer aufgeschlossen (ca. 1 ml Puffer/mg Protein). Das Pellet wurde dabei vorsichtig zerrieben und die Probe dann kurz in der Hand erwärmt. Nicht gelöstes Material wurde abzentrifugiert. Das aufgeschlossene Material wurde mit zehn Volumina Puffer A verdünnt und langsam durch die Säule laufen gelassen (5 ml/Stunde). Dann wurde mit dem gleichen Volumen Puffer A nachgewaschen, auch in diesem Schritt ist ein langsamer Durchfluß wichtig (5 ml/Stunde oder weniger). Anschließend wurde mit Elutionspuffer, in einem Schritt, eluiert. Um die geringen Enzymmengen, die zur Verfügung standen konzentriert zu eluieren, erwies sich eine schnelle Elution als vorteilhaft (50 ml/Stunde). Das Eluat wurde fraktioniert und durch Zugabe von BSA (0.5 mg/ml Endkonzentration) stabilisiert. Enzympräparationen, die nicht sofort für Experimente verwendet wurden, konnten durch Zugabe von Glycerin auf 50% und Lagerung bei -20°C für viele Wochen aktiv erhalten werden (mit Ausnahme des Enzyms aus REV).

Wenn die p(C)-Sepharose nicht frisch hergestellt war, so mußte unmittelbar vor Durchführung der Chromatographie die Säule mit Elutionspuffer und anschließend mit einem großen Volumen Puffer A gewaschen werden, um freies p(C) herauszuwaschen. Unterblieb dieser Schritt, so befand sich p(C) im eluierten Enzym.

7. Sedimentationsanalyse von Enzymen in Glyceringradienten

Es wurden die von Marcus et al. (92) beschriebenen Bedingungen verwendet.

Gradient: 10-30% (vol/vol) Glycerin in 10 mM K-Phosphatpuffer, pH 8.0, 1 mM DTT, 0.4 M KCl.

Verwendet wurde der Rotor SW 56 oder SW 50.1.

Die Zentrifugation erfolgte bei 45 000 Upm und 4°C, für ca. 17 Stunden. Der Gradient wurde von unten fraktioniert und Aliquots jeder Probe in Standardreaktionsansätze eingesetzt. Die Position von Markerproteinen in Parallelgradienten wurde durch Messung der Proteinkonzentration bestimmt.

8. IgG-Neutralisationstest

Der Test wurde nach der Methode von Watson et al. (93) durchgeführt.

Konstante Mengen Enzym (jeweils 20 µl frisch eluiertes Enzym) wurden in Reaktionsansätzen von 50 µl in Gegenwart von 160 mM KCl, 0.4 mM DTE, 4 mM Phosphat, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 50 µg BSA/50 µl und 14% Glycerin mit steigenden Mengen IgG oder ohne IgG inkubiert. Der Verdünnungspuffer für IgG war 10 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM KCl. Die Inkubation erfolgte bei den ersten Experimenten bei 37°C für 15 Minuten, bei späteren Experimenten bei 0-4°C über Nacht. Anschließend wurde der Ansatz auf Standardreaktionsbedingungen gebracht und die Aktivität in Abhängigkeit von $p(C)(dG)_{12}$ gemessen. Ansätze die ohne IgG inkubiert worden waren dienten als 100%-Vergleichswert.

Die IgG-Präparationen wurden bei -20°C gelagert und konnten auch nach mehrmaligem Auftauen und Einfrieren verwendet werden.

9. Dichtegradientenzentrifugation in Cs_2SO_4 (Nukleinsäuren)

Die Probe wurde mit 8 ml Cs_2SO_4 -Lösung (in STE) gemischt. Die Dichte der Lösung betrug 1.55 g/cm^3 (Refraktionsindex = 1.378). Das Gemisch wurde in ein für den Festwinkelrotor Ti 50 passendes Polyallomerröhrchen gegeben, mit Paraffin überschichtet und bei 40 000 Upm für 50-60 Stunden zentrifugiert (= übers Wochenende). Die Temperatur wurde dabei auf 15°C gehalten (Vorsicht: bei tieferen Temperaturen kann unter Umständen Cs_2SO_4 auskristallisieren, das den Rotor zerstören kann.)

Nach dem Lauf wurde von unten fraktioniert, die Refraktion der einzelnen Fraktionen bestimmt und die TCA-fällbare Radioaktivität pro Fraktion bestimmt.

Die Umrechnung von Refraktion auf Dichte erfolgte durch Verwendung der Angaben in (94).

10. Dichtegradientenzentrifugation in Rohrzucker (Partikel, Viren)

Die linearen Gradienten mußten hier mit Hilfe eines zweikammerigen Mischgefäßes geformt werden. Die Rohrzuckerlösungen (meist 20 und 50%) enthielten STE. Die Dichtebestimmung der einzelnen Fraktionen nach dem Lauf erfolgte durch Messung der Refraktion in einem Refraktometer, das direkt die Gewichtsprozentage der gemessenen Rohrzuckerlösung anzeigte. Die Umrechnung von Gewichtsprozenten in Dichte erfolgte nach (95). Siehe auch Legende zu Figur 2.

11. Reinigung des Produktes aus Reverse Transkriptase-Reaktionsansätzen

a) Grobreinigung

Für einige Zwecke genügte eine grobe Reinigung. Dazu wurde der Reaktionsansatz auf ca. 0.5 ml verdünnt (STE), auf 1% SDS gebracht und phenolisiert. Die Phenolphase wurde mit dem gleichen Volumen Puffer ausgeschüttelt, und die beiden wäss-

rigen Phasen aus erster und zweiter Phenolisation vereinigt und mit dem gleichen Volumen Phenol wiederum ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde abgenommen, 200-500 µg t-RNA (E. coli), 1/10 Volumen 4 M NaCl und 2.5 Vol. absoluter Alkohol zugegeben. Nach Lagerung bei -20°C über Nacht, konnten die präzipitierten Nukleinsäuren durch Zentrifugation in der Sorvall-Zentrifuge (12 000 Upm, 20 min, -20°C) gesammelt werden. (Phenol wurde bei -20°C gelagert und enthielt 0.08% Hydroxychinolin. Vor Verwendung wurde das Phenol warm mit STE gesättigt und neutralisiert.)

b) Feinreinigung

Es wurde die von Reitz et al. (96) beschriebene Methode verwendet.

Der Ansatz wurde zunächst wie bei der Grobreinigung phenolisiert und die wässrige Phase aufbewahrt. Zu dieser wurde das gleiche Volumen Äther zugegeben (in der Kälte), ausgeschüttelt, nach der Phasentrennung die wässrige Phase gewonnen und ein zweites Mal mit Äther ausgeschüttelt. Durch Einleiten von N₂ in die wässrige Phase wurden Ätherreste entfernt. (Mit dem Äther entweicht auch die beängstigende Trübung der wässrigen Phase, die dem Produkt jedoch keinen Schaden zufügt.) Es wurden nun 500 µg E. coli t-RNA zugegeben und 25 µl 0.1 M Hexadecyltrimethylammoniumbromid langsam zugegeben. Nach 30 Minuten im Eisbad konnten die gefällten Nukleinsäuren in der Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert werden (15 000 Upm, 0°C, 30 Minuten). Das Sediment wurde in 1 ml NaCl gelöst und einer abschließenden Alkoholfällung unterzogen. Durch diese Reinigungsmethode konnten 99.7% der nichteingebauten Deoxynukleosidtriphosphate abgetrennt werden. Die Ausbeute an Produkt nach all diesen Schritten lag bei ca. 50%.

12. Standardbedingungen für den Verdau mit S1-Nuklease

Es wurden die von Vogt (97) beschriebenen Bedingungen eingehalten.

Das Reaktionsvolumen betrug zwischen 100-500 μ l.

Die Endkonzentrationen betrugen: 30 mM Na-Acetat, pH 4.6

50 mM NaCl

1 mM ZnSO_4

Pro Testansatz wurden 0.2-0.5 Einheiten gereinigte S1-Nuklease eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 60 Minuten. Zusätze wie z.B. 1/10 Volumen SSC-Puffer oder 5% Formamid (Endkonzentration!) störten den Test nicht!

Nach der Inkubation wurde unter Zugabe von 100 μ g BSA und 10% TCA (auf eine Endkonzentration von wenigstens 5%) das säureunlösliche Material gefällt und über Nitrocellulosefilter gesammelt. Nach dem Nachwaschen (5% TCA) wurden die Filter getrocknet und in Toluolszintillator zur Bestimmung der meßbaren Radioaktivität gegeben.

13. Alkaliverdau zur Gewinnung freier DNA

Die gereinigten Reaktionsprodukte wurden auf 0.3 M KOH gebracht und bei Raumtemperatur für 24 Stunden stengelassen. Anschließend wurde durch Zugabe von 2 M HCl neutralisiert. Diese lange Behandlung bei niedriger Temperatur ist der oft in der Literatur beschriebenen Methode (kurze Zeit, hohe Temperatur) vorzuziehen, weil dGTP und dATP in heißer alkalischer Lösung das Tritiumatom in Position 8 des Purinringes gegen normale Wasserstoffatome aus dem umgebenden Milieu austauschen können.

14. Hybridisationsansätze

Gereinigte und von Template befreite cDNA wurde zusammen mit einem Überschuß hinzugegebener Template-RNA in einem Volumen von 100 µl inkubiert. Die Endkonzentrationen betrugen 0.4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA, 50% (vol/vol) Formamid. In der Regel befanden sich im Ansatz 5 µg der RNA, gegen die rückhybridisiert werden sollte. Inkubation erfolgte bei 37°C für 24 Stunden. Der Ansatz konnte dann direkt für Cs₂SO₄-Dichtegradientenanalyse oder für Tests auf S1-Sensitivität verwendet werden. Die Hybridisationsbedingungen entsprechen den von Spiegelman et al. (98) verwendeten Bedingungen.

15. SDS-Gelelektrophorese zur Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen

Es wurde die von Laemmli (99) beschriebene Methode verwendet.

Benötigte Lösungen:

Acrylamidstammlösung: 30% Acrylamid (w/vol)
0.8% Methylenbisacrylamid

1 M Tris-HCl, pH 6.8

1 M Tris-HCl, pH 8.8

20% SDS

TEMED (100%) (Tetramethyläthylendiamin)

10% Ammoniumperoxydisulphat (frisch ansetzen!)

Laufpuffer-10X-Konzentrat: 30 g Tris/l
144 g Glycin/l

Auftragspuffer: 5 ml 1 M Tris-HCl, pH 6.8
12.5 ml 20% SDS
2.5 ml Mercaptoäthanol
10 ml 0.05% Bromphenolblau
5.6 ml Glycerin (87%)
14.4 ml H₂O

Zusammensetzung des Trenngels:

Acrylamid-Stammlösung	16.5 ml
20% SDS	0.25 ml
1 M Tris, pH 8.8	18.7 ml
H ₂ O	14.3 ml
TEMED	20 µl
Ammoniumperoxydisulphat	0.15 ml

Zusammensetzung des Sammelgels:

Acrylamid	2.0 ml
20% SDS	0.1 ml
1 M Tris, pH 6.8	2.5 ml
H ₂ O	15.2 ml
TEMED	20 µl
Ammoniumperoxydisulphat	0.2 ml

Herstellung der Gele: Es wurden Plattengele verwendet. Das Gelmaterial befindet sich zwischen zwei Glasplatten, die durch beidseitig eingelegte Kunststoffleisten einen Abstand von 2-3 mm voneinander besitzen. Zum Gießen konnte die Unterseite durch ein genau passendes Stück verschlossen werden. Die Platten wurden senkrecht eingespannt, und zunächst das Trenngel gegossen. Die Mischung ist oben angegeben. Vor Zugabe des Ammoniumperoxydisulphats wurde die kalte Lösung an der Wasserstrahlpumpe entlüftet, dann wurde das Ammoniumperoxydisulphat zugegeben, vermischt, ohne Blasen entstehen zu lassen, und die Lösung zügig zwischen die Glasplatten gegossen. Die Höhe des Trenngels sollte etwa 11-12 ml betragen. Es wurde nun vorsichtig mit H₂O überschichtet (Ausbildung einer geraden Oberfläche) und das Gel erschütterungsfrei stehengelassen. Nach dem Polymerisieren wurde das Wasser abgekippt und nach dem gleichen Prinzip wie vorher, das Sammelgel auf das Trenngel gegossen (Höhe etwa 3-4 cm). Durch einen "Kamm", der auf die Oberfläche des flüssigen Sammelgelmaterials gesteckt wurde, waren in dem festen Sammelgel Taschen für die Proben ausgebildet.

Vor dem Lauf wurden Ober- und Unterseite des Plattengels kurz gespült (mit Laufpuffer) und dann wurde das Gel (+ Glasplatten) in eine Vorrichtung gespannt, die eine obere und untere Pufferkammer enthielt, die jeweils mit dem Gel in Kontakt waren. Die Pufferkammern wurden mit Laufpuffer gefüllt (10X Konzentrat 1:10 verdünnt, + 5 ml 20% SDS/l) und die in Auftragpuffer aufgenommenen Proben in die Taschen gefüllt. Platinelektroden in den beiden Pufferkammern wurden an ein Spannungsgerät angeschlossen (Kathode oben). Bei einer angelegten Spannung von 100 V floss ein Strom von ca. 10 mA. Nach etwa 16 Stunden war das Bromphenolblau am unteren Rand angekommen. Die Elektrophorese wurde beendet und das Gel nach vorsichtigem Herausnehmen mit Coomassie-Blau gefärbt.

(30 Minuten im Färbebad = 5 Vol. H₂O, 5 Vol. Methanol,
1 Vol. Eisessig, 0.25%
Coomassie-Blau.

Anschließend Entfärben im Entfärbebad = 150 ml Eisessig,
100 ml Methanol, ad 2 l H₂O.)

Als Vergleichsproteine wurden verwendet:

Cytochrom C	MW 12 400
Myoglobin	17 800
Chymotrypsinogen A	25 000
Albumin (Ei)	45 000
Rinderserumalbumin	67 000
Aldolase	4 x 40 000
Katalase	4 x 60 000

Die Vergleichsproteine wurden in Auftragspuffer gelöst, dann durch Aceton-Eisessig gefällt und wieder in Auftragspuffer aufgenommen. Pro Gelspur wurden 1 - 2 µg jedes Markerproteins aufgetragen.

16. Weitere Methoden

Alle sonstigen verwendeten Methoden sind in den Legenden der entsprechenden Abbildungen dargestellt.

D. ERGEBNISSE

I. Charakterisierung einer Reverse Transkriptase-tragenden Partikelfraktion

1. DNA-Polymeraseaktivitäten in der Allantoisflüssigkeit

Die isolierte Allantoisflüssigkeit bebrüteter (10 Tage) leukosevirus-freier Hühnereier wurde zunächst durch nientourige Zentrifugation von Zellen und Zelldebris befreit. Anschließend wurde die Flüssigkeit einer Ultrazentrifugation im Festwinkelrotor R 30 unterzogen. Der Niederschlag wurde in STE-Puffer resuspendiert und durch eine 20%ige Rohrzuckerschicht im Rotor SW 27.1 auf eine 50%ige Rohrzuckerschicht zentrifugiert. Die Schicht über der 50%igen Rohrzuckerlösung wurde abgenommen und die DNA-Polymeraseaktivitäten in Abhängigkeit der folgenden Template-Primer-Komplexe bestimmt:

- a) p(C)(dG)₁₂, um RNA-abhängige DNA-Polymerase zu erfassen;
- b) p(A)(dT)₁₂, um RNA-abhängige DNA-Polymerase und DNA-Polymerase γ zu erfassen;
- c) p(dA)(dT)₁₂, um DNA-Polymerase α und β zu erfassen.

Das Ergebnis des Experiments (Tab. 1) läßt darauf schließen, daß ein Gemisch verschiedener DNA-Polymerasen vorliegt. Jedenfalls sind die erhaltenen Einbauwerte, wie ein Vergleich mit Tab. I zeigt, für keine der genannten Polymerasen typisch. Der mit p(C) als Template erhaltene relativ hohe Wert läßt auf das Vorkommen einer Reversen Transkriptase schließen.

Da das getestete Material durch relativ kurze Sedimentation erhalten worden war, kann es sich nicht um freie Polymerasen, sondern nur um strukturgebundene ("partikelgebundene") DNA-Polymerasen handeln. Um herauszufinden, ob die Enzyme frei zugänglich an Partikeln, oder in Partikel eingeschlossen,

Tab. 1: Homopolymer-abhängige DNA-Polymerase-Aktivitäten der "Partikelrohfraktion".

Template-Primer-Komplex	markiertes dNTP	eingebautes ^3H -dNMP (cpm)
p(C) (dG) ₁₂	^3H -dGTP	16 629
p(A) (dT) ₁₂	^3H -dTTP	8 648
p(dA) (dT) ₁₂	^3H -dTTP	55 159

Die Allantoisflüssigkeit 10 Tage bebrüteter leukose-virus-freier Eier wurde durch niedertourige Zentrifugation von Zellen und Zelldebris befreit. Sie wurde anschließend im Festwinkelrotor P 30 für 45 Minuten bei 27 000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die Niederschläge wurden in STE-Puffer (0.1 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0, 0.001 M EDTA) resuspendiert und auf einen Stufengradienten im Rotor SW 27.1 überschichtet. Das Material wurde durch die 20%ige Rohrzuckerschicht auf eine 50%ige Rohrzuckerschicht zentrifugiert (26 000 Upm, 4°C, 2.5 Stunden). Das Material über der 50%igen Schicht wurde abgenommen und auf eine Proteinkonzentration von 0.5 mg/ml gebracht. Jeweils 9 µg wurden in Standardreaktionsansätzen in Gegenwart der genannten Template-Primer-Komplexe und markierten Vorstufen bei 37°C inkubiert. Die Ansätze (100 µl) enthielten das nichtionische Detergenz NP 40 in einer Konzentration von 0.1 Volumenprozent. Pro 100 µl Ansatz waren 1 µg Template-Primer-Komplex und 5 µCi markierte Vorstufe (8 Ci/mMol) eingesetzt. Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe von Trichloressigsäure gestoppt und der Einbau von Radioaktivität in säureunlösliches Material bestimmt.

vorliegen, wurde das Material nochmals mit oder ohne Zugabe von nicht-ionischem Detergenz NP 40 auf Polymerase-Aktivität ausgetestet. Die folgende Tabelle 2 zeigt, daß die RNA [p(A),p(C)]-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität nur nach Detergenzzugabe zu messen ist, während dies für die DNA p(dA)-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität nicht zutrifft.

Tab. 2: Test der Homopolymer-abhängigen DNA Polymerase-Aktivität in Gegenwart bzw. Abwesenheit von NP 40.

Template-Primer-Komplex	NP 40	% Einbau
p(A) (dT) ₁₂	+	100
p(A) (dT) ₁₂	-	4.8
p(C) (dG) ₁₂	+	100
p(C) (dG) ₁₂	-	1.5
p(dA) (dT) ₁₂	+	100
p(dA) (dT) ₁₂	-	94

Reaktionsbedingungen und eingesetztes Material entspricht den Angaben der vorhergehenden Tabelle. In Parallelansätzen wurde NP 40 entweder zugegeben (0.1%) oder durch Wasser ersetzt. Der Wert + NP 40 wurde jeweils als 100% angesetzt.

Abtrennung der p(dA)-abhängigen (strukturebundenen DNA-Polymeraseaktivität von der RNA p(C)-abhängigen Aktivität. Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß das durch Sedimentation gewonnene Material zwei verschiedene Polymerase-Aktivitäten enthält, von denen die p(C)-abhängige in NP 40-empfindlichen Partikeln eingeschlossen ist.

Unter der Annahme, daß die beiden Aktivitäten auf, bzw. in verschieden großen Partikeln lokalisiert sind, wurde versucht, eine Trennung der Aktivitäten durch Separierung der Partikel mittels Band-Sedimentation zu erreichen. Das Rohmaterial wurde deshalb einem kurzen Sedimentationslauf in einem kontinuierlichen Rohrzuckergradienten unterzogen, in Fraktionen abgenommen und die DNA-Polymerase-Aktivität der einzelnen Fraktionen in Abhängigkeit von den drei Homopolymerkomplexen p(C) (dG)₁₂, p(A) (dT)₁₂ und p(dA) (dT)₁₂ bestimmt.

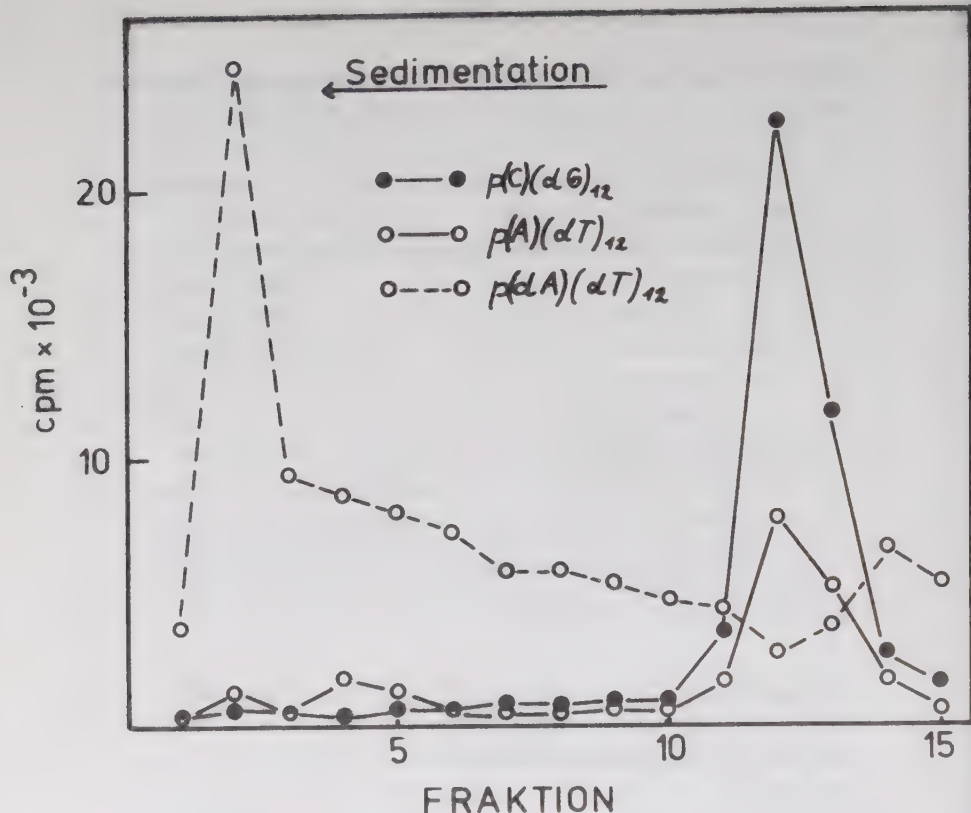


Fig. 1: Kurzer Sedimentationslauf der Rohfraktion.

Die Rohfraktion wurde auf einen kontinuierlichen Rohrzuckergradienten (20 - 35%) überschichtet (SW 27.1) und für 50 Minuten bei 26 000 Upm, 4°C zentrifugiert. Fraktionen à 1.1 ml wurden abgenommen und jeweils 20 µl mit den drei Homopolymerkomplexen $p(C)(dG)_{12}$, $p(A)(dT)_{12}$ und $p(dA)(dT)_{12}$ in Standardreaktionsansätzen, in Gegenwart des entsprechenden tritiierten Deoxynukleosidtriphosphates und NP 40 (0.1%) für 60 Minuten inkubiert und der Einbau in säureunlösliches Material bestimmt.

Die Sedimentationsanalyse (Fig. 1) zeigt, daß die verschiedenen DNA-Polymeraseaktivitäten tatsächlich auf Strukturen lokalisiert sind, die verschieden schnell sedimentieren. Damit bietet diese Methode prinzipiell die Möglichkeit, die Aktivitäten auch in präparativem Maßstab voneinander zu trennen.

2. Charakterisierung der Schwimmdichte der Partikel mit RNA-abhängiger DNA-Polymeraseaktivität

Zur weiteren Charakterisierung und Reinigung der interessierenden p(C)-abhängigen Aktivität wurden die Fraktionen Nr. 7 - 10 vereinigt und einem Gleichgewichtslauf im Rohr-zuckergradienten unterworfen. Nach dem Lauf wurde wieder fraktioniert, und die DNA-Polymerase-Aktivitäten und die jeweilige Schwimmdichte der Fraktionen bestimmt.

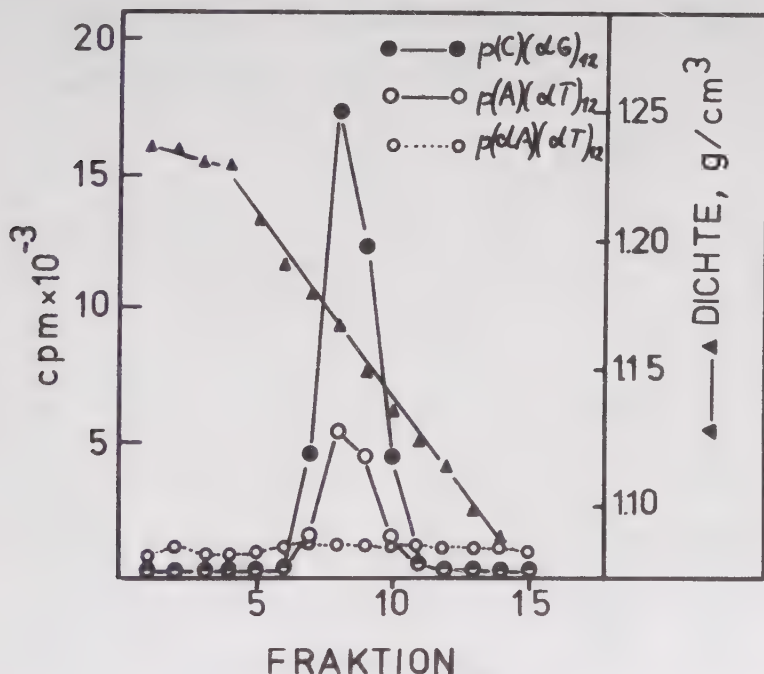


Fig. 2: Dichtegradientenzentrifugation der Partikel mit RNA-abhängiger DNA-Polymeraseaktivität.

Die Peakfraktionen aus dem Sedimentationsgradienten (Fig. 1) wurden vereinigt und auf einen kontinuierlichen Rohr-zuckergradienten (25 - 50%) im Rotor SW 41 Ti überschichtet. Nach einem 16-stündigen Lauf bei 30 000 U_{pm} bei 4°C wurde der Gradient von unten fraktioniert. Die Dichte der einzelnen Fraktionen konnte über Refraktionsmessungen bestimmt werden, der Aktivitätstest erfolgte wie in der Legende zur Fig. 1 beschrieben. Aufgetragen ist der jeweilige Einbau radioaktiver Vorstufen in säureunlösliches Material pro Stunde und 100 µl Reaktionsvolumen.

Während die verbliebene p(dA)-abhängige Aktivität über den ganzen Gradienten verteilt ist, erkennt man, daß die partikulär-gebundene RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität in einem definierten Dichtebereich von 1.15 - 1.16 g/cm³ zu finden ist (Fig. 2).

3. Abhängigkeit der RNA-abhängigen DNA-Synthese von der Zeit und der Partikelkonzentration

Figur 3 und 4 zeigen, daß die RNA-abhängige DNA-Polymerase-reaktion in linearer Abhängigkeit von der Zeit und der Par-

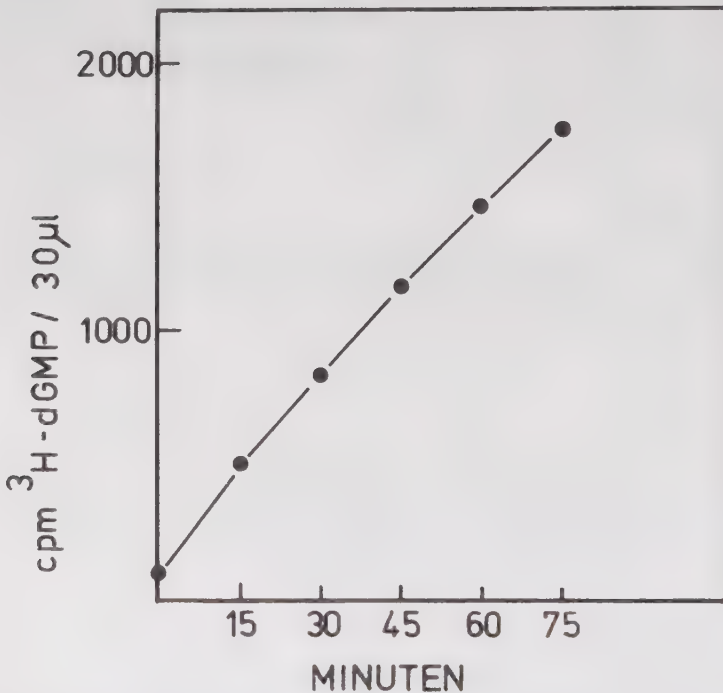


Fig. 3: Abhängigkeit der RNA-abhängigen DNA-Polymerase von der Zeit.

40 µl der Fraktion 7 des in Fig. 2 beschriebenen Dichtegradienten wurden in einen Standardansatz von 200 µl eingesetzt. Als Template-Primer diente p(C)(dG)₁₂ in der Konzentration von 10 µg/ml. Der Ansatz enthielt 10 µCi ³H-dGTP und NP 40 in einer Konzentration von 0.1%. Zu den angegebenen Zeiten wurden 30 µl entnommen und der Einbau radioaktiven Materials in säureunlösliche Nukleinsäure bestimmt.

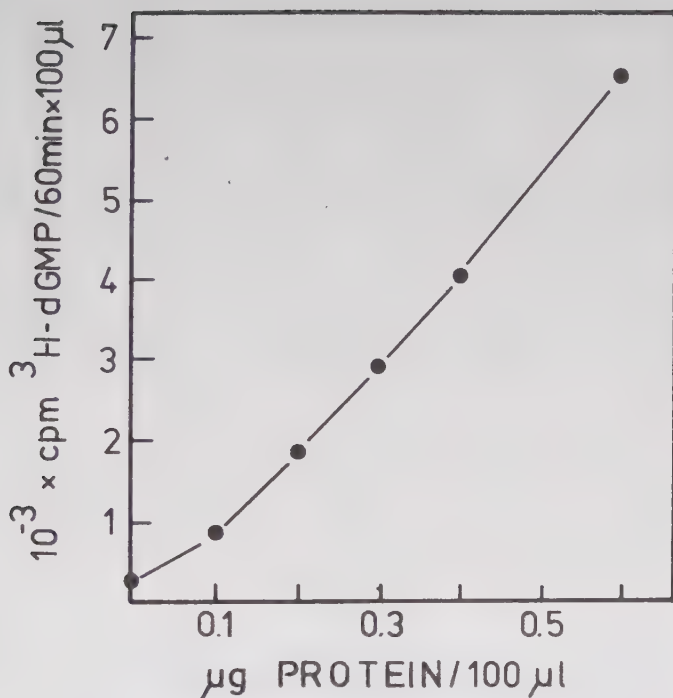


Fig. 4: Abhängigkeit der Reaktion von der Konzentration an Partikelprotein.

Steigende Volumina der Fraktion 7 des Dichtegradienten (0.02 mg Protein/ml) wurden in Standardreaktionsansätze mit $p(C)(dG)_{12}$ als Template-Primer eingesetzt und der Einbau in säureunlösliches Material nach einer Inkubation bei 37°C und 60 Minuten bestimmt.

tikelkonzentration verläuft. Die spezifische Aktivität der hier getesteten Präparation liegt bei 2 pMol polymerisiertes dGTP pro μg Partikelprotein und Stunde. Spätere bessere Aufarbeitungen besaßen spezifische Aktivitäten von 8 - 12 pMol dGTP-Einbau/ $\mu\text{g} \times 60 \text{ min.}$, wobei ebenfalls Linearität des Einbaus bezüglich der Zeit gegeben war. Diese hier angegebenen Werte gelten nur für den Standardansatz mit einer dGTP-Konzentration von 6 μM . Diese Konzentration wurde aus

meßtechnischen und (vor allem) finanziellen Gründen gewählt. Sie liegt unterhalb der Konzentration, die für das Erreichen maximaler Reaktionsgeschwindigkeit benötigt wird. Wenn diese - für das Enzym - optimale Substratkonzentration durch Zugabe unmarkierten Deoxynukleosidtriphosphats eingestellt wird, sinkt die spezifische Radioaktivität des Substrates so stark ab, daß die in diesem System vorliegenden relativ sehr geringen Enzymmengen nur sehr unbefriedigend im Aktivitätstest gemessen werden können. Würde man die Erhöhung der Substratkonzentration durch vermehrte Zugabe von radioaktiv markiertem Deoxynukleosidtriphosphat bewerkstelligen, würden die Kosten pro Test und die Menge radioaktiver Abfall pro Test ein vertretbares Maß weit übersteigen.

Die Enzymaktivität einer späteren Aufarbeitung war hoch genug, um in Gegenwart von unmarkiertem Deoxynukleosidtriphosphat im Bereich der Substratsättigung messen zu können. Es ergab sich dabei eine spezifische Aktivität von 109 pMol eingebautes dGTP/ μ g Partikelprotein X Stunde.

4. Charakterisierung der Homopolymer-abhängigen reversen Transkription durch das partikelgebundene Enzym

Zur weiteren Charakterisierung wurde die Fraktion 8 des Dichtegradienten einer Reihe verschiedener Test unterzogen. Wie Tab. 3 zeigt, ist die Reaktion abhängig von der Anwesenheit von Template, Primer und der entsprechenden DNA-Vorstufe. Sie läuft nur in der Gegenwart von NP 40 zur Öffnung der Partikelmembran ab und benötigt Magnesiumionen. Die partikelgebundene Aktivität zeigt die für Reverse Transkriptasen typische Vorliebe von p(A)(dT)₁₂ gegenüber p(dA)(dT)₁₂. Mit der Modell-DNA p(dC)(dG)₁₂ läßt sich, wie für die viralen Reversen Transkriptasen bekannt, auch DNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität nachweisen. Das sehr gute Einbaue Ergebnis mit dem Template-Primer-Komplex p(C)(dG)₁₂ ist typisch für Reverse Transkriptasen und schließt DNA-Poly-

merase α , β oder γ als an der Reaktion beteiligte Enzyme bereits weitgehend aus. Die entscheidende Frage ist jedoch, ob natürliche, heteropolymere RNA als Template für Reverse Transkription durch das Enzym verwendet wird.

Tab. 3: Homopolýmer-abhängige DNA-Synthese der Partikel, die durch Sedimentationsgradient und Dichtegradient gereinigt worden waren:

Template- Primer	^3H -dNTP	Reaktions- bedingungen	Einbau ^3H -dNMP cpm/60 Min x 100 μl
p(C)	dGTP	komplett	159
(dG) ₁₂	dGTP	komplett	0
p(C) (dG) ₁₂	dGTP	-NP 40	104
p(C) (dG) ₁₂	dGTP	-Partikel	0
p(C) (dG) ₁₂	dGTP	-Mg ⁺⁺	0
p(C) (dG) ₁₂	dGTP	komplett	17 179
p(C) (dG) ₁₂	dTTP	komplett	0
p(dC) (dG) ₁₂	dGTP	komplett	4 100
p(A) (dT) ₁₂	dTTP	komplett	5 168
p(dA) (dT) ₁₂	dTTP	komplett	720

20 μl der Fraktion 8 des Dichtegradienten (ca. 0.5 μg) wurden in Reaktionsansätze eingesetzt, die Standardansätzen entsprachen, jedoch die in der Tabelle angeführten Veränderungen aufwiesen. Das Reaktionsvolumen betrug jeweils 100 μl . Nach 60 Minuten wurde der Einbau in säureunlösliches Material bestimmt. Ein Blindwert von 150 cpm wurde von allen Werten abgezogen.

In einer Reihe von Experimenten wurden, teilweise durch kinetische Messungen, die optimalen Bedingungen für die p(C)-abhängige DNA-Polymerisationsreaktion bestimmt. Da im 2. Teil dieser Arbeit, der sich mit den Eigenschaften der isolierten RNA-abhängigen DNA-Polymerase aus den Partikeln befaßt, eine ausführliche Darstellung von Experi-

menten zur Bestimmung der Optima des gereinigten Enzyms gebracht wird, soll an dieser Stelle auf eine ausführliche Darstellung der Optimumkurven für das partikelgebundene Enzym verzichtet werden.

Folgende Optima wurden für das partikelgebundene Enzym gefunden:

Temperatur:	37 - 42°C
pH	: 8 - 8.5
Mg ⁺⁺	: 10 - 20 mM
K ⁺	: 40 - 60 mM; bei vollständigem Fehlen von K ⁺ (jedoch Anwesenheit von 5 - 10 mM Na ⁺) werden noch 60% der max. Akt. gemessen.

5. Reverse Transkription heteropolymerer RNA durch das partikelgebundene Enzym

Da das wesentliche Charakteristikum einer Reversen Transkriptase ihre Fähigkeit ist, abhängig von heteropolymerer RNA eine DNA-Kopie herzustellen, wurde untersucht, ob das partikelgebundene Enzym Globin-mRNA als Template verwenden kann. Von Ross (100) und Verma (101) war gezeigt worden, daß Globin-mRNA ein sehr effizientes Template für Reverse Transkriptasen darstellt. Voraussetzung ist dabei, daß der Ansatz Oligodeoxythymidylsäure (dT)₁₂ enthält, die mit dem Polyadenylsäurebereich am 3'-Ende der mRNA Basenpaarung eingeht und ein freies 3'-Hydroxylende zum Start der Polymerisationsreaktion bereitstellt. Damit nur die reverse Transkription des heteropolymeren Teiles der mRNA gemessen wird, darf im Reaktionsansatz kein radioaktiv markiertes dTTP vorhanden sein. (Einen Überblick über die Reaktion gibt Teil C der Schemazeichnung I.) Die folgende Figur 5 zeigt, daß das partikelgebundene Enzym in der Lage ist, Globin-mRNA (+ dT₁₂) als Template zu verwenden. Der in diesem Experiment gemessene Einbau von ³H-dGMP in säureun-

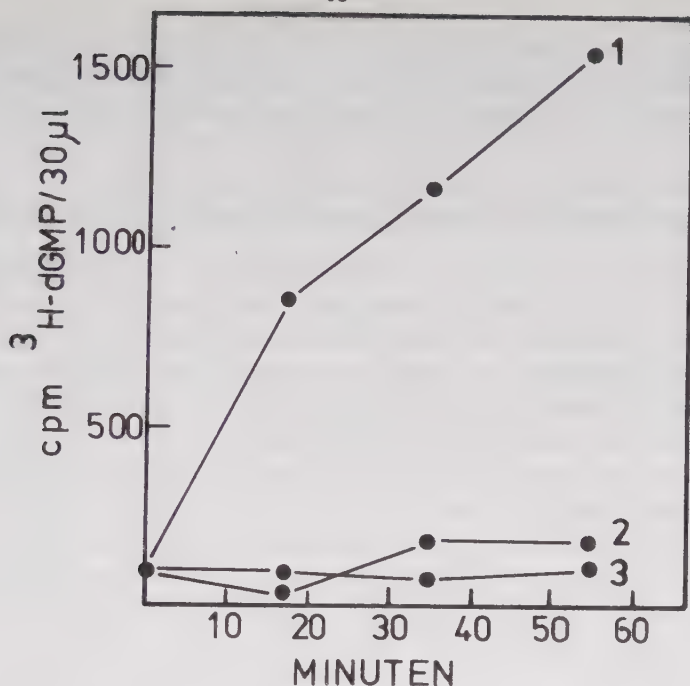


Fig. 5: Globin mRNA-abhängige, heteropolymere DNA-Synthese durch partikelgebundene RNA-abhängige DNA-Polymerase.

Standardreaktionsansätze enthielten 1.6 μg gereinigte Partikel, 0.1% NP 40, dTTP, dCTP, dATP in einer Endkonzentration von jeweils 0.6 mM. Pro 100 μl waren 10 μCi ^3H -dGTP (8 Ci/mMol) eingesetzt. Der komplette Ansatz (Nr. 1) enthielt 2.5 μg Globin mRNA und 1 μg $(\text{dT})_{12}$ pro 100 μl . Ansatz Nr. 2 enthielt keine mRNA (jedoch $(\text{dT})_{12}$). Ansatz Nr. 3 enthielt mRNA und $(\text{dT})_{12}$ und zusätzlich pankreatische RNase in einer Endkonzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Zu den angegebenen Zeiten wurden 30 μl entnommen und die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt.

lösliches Material erfolgt nur, wenn sich Globin-mRNA im Ansatz befindet. In Gegenwart von RNase im kompletten Ansatz zeigt sich kein Einbau. Dies beweist, daß die DNA-Synthese von der Globin-mRNA gesteuert wird. Das Fehlen einer Reaktion bei Weglassen der mRNA (in Gegenwart von $(\text{dT})_{12}$) zeigt, daß sich keine als Template verwendbare Nukleinsäure im Ansatz befand und daß die Partikel keine endogene Reaktion durchfüh-

ren. Die Produktanalyse und der exakte Nachweis, daß eine basenkomplementäre DNA-Kopie der Globin-mRNA synthetisiert wurde, wird zusammen mit der Produktanalyse der von gereinigtem Enzym katalysierten Reaktion erbracht

6. Verbreitung der Reverse Transkriptase-tragenden Partikel

Durch die bisher geschilderten Experimente wurde gezeigt, daß in der Allantoisflüssigkeit von (nach biologischen und immunologischen Kriterien) Leukosevirus-freien Eiern Partikel nachzuweisen sind, die Reverse Transkriptase enthalten. Es stellte sich nun die Frage, ob diese Partikel regelmäßig in allen Eiern vorkommen, oder ob die Partikel einer Präparation nur von einigen wenigen Eiern herrühren. Deshalb wurde in zwei Versuchsreihen die Allantoisflüssigkeit von insgesamt 38 bebrüteten Eiern des Cuxhavener Stammes einzeln isoliert, aufgearbeitet und auf Reverse Transkriptase getestet. Nach der Entnahme der Allantoisflüssigkeit und dem Abtrennen von Zellen und Zelldebris wurden jeweils 3.2 ml auf 1 ml einer 20%igen Rohrzuckerschicht (in STE-Puffer) in einem Rotor SW 56-Gehänge überschichtet und für 40 Minuten bei 40 000 Upm zentrifugiert. Der Überstand und die Rohrzuckerschicht wurden vorsichtig abgenommen, um auf diese Weise die in der Allantoisflüssigkeit in großer Konzentration vorkommenden Nukleasen von den pelletierten Partikeln zu trennen. Die RNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität wurde dann mit dem spezifischen Template-Primer-Komplex $p(C)(dG)_{12}$ und 3H -dGTP als Substrat bestimmt. In jedes Zentrifugenröhrchen wurden 90 μ l Reaktionsmix, der 1 μ g $p(C)(dG)_{12}$, 5 μ Ci 3H -dGTP und 0.1% NP 40 enthielt, zugegeben, die Röhrchen wurden mit Parafilm verschlossen und bei 37°C für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Einbau von 3H -dGMP in säurefällbares Material bestimmt. Der Blindwert wurde aus einem Röhrchen ohne sedimentierte Allantoisflüssigkeit erhalten. Er betrug 150 cpm und wurde von allen Werten abgezogen.

Man erkennt aus Figur 6 deutlich, daß bei einem mittleren Wert von 12 000 cpm jedes Ei wenigstens mehr Enzymaktivität aufweist, um 500 cpm ^3H -dGMP einzubauen.

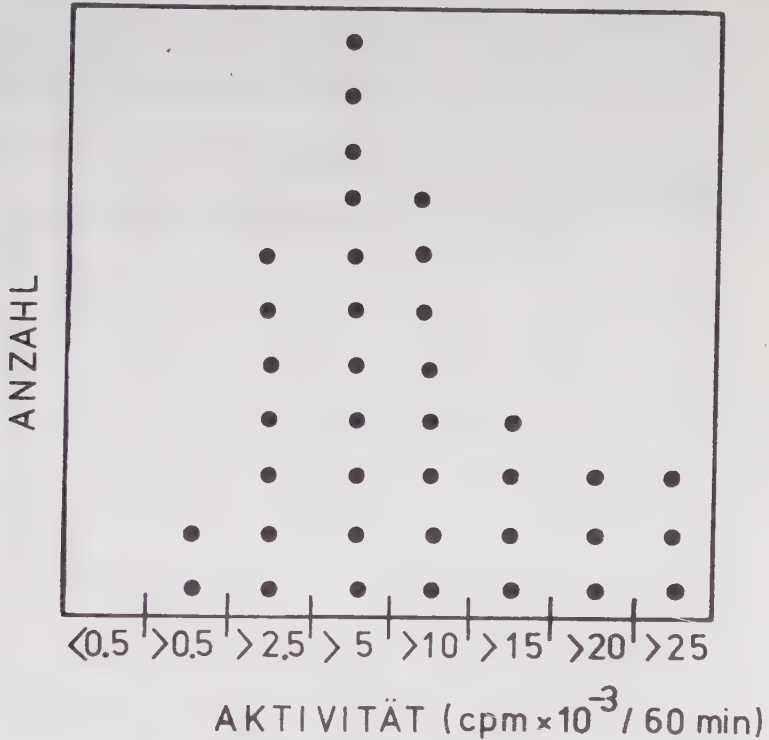


Fig. 6: RNA-abhängige DNA-Polymerase-Aktivität der Allantoisflüssigkeit einzelner Eier des Cuxhavener leukosevirus-freien Stammes.

Allantoisflüssigkeit aus 38 einzelnen Eiern wurde wie im Text beschrieben isoliert und vorgereinigt und die $p(C)(dG)_{12}$ -abhängige DNA-Polymerase-Aktivität bestimmt. Die Aktivitäten wurden in der Tabelle nach Größenklassen sortiert.

Nachdem mit diesem Ergebnis feststand, daß innerhalb einer Herde alle Eier Enzym-Partikel besitzen, wurde die Allantoisflüssigkeit aus Eiern von drei weiteren Herden, wie bereits beschrieben, auf Enzym-Partikel aufgearbeitet.

Im einzelnen handelt es sich um

- a) Eier einer Hühnerfarm in Moosburg/Oberbayern
- b) virusfreie Eier von SPAFAS Inc., Connecticut, die ständig virologisch überprüfte Herden für wissenschaftliche Zwecke hält
- c) Eier einer SPAFAS Ableger-Herde, im Genotyp $gs^- chf^-$, was die Genexpression integrierter endogener Leukoseviren verhindert.

In allen Fällen wurden Enzympartikel mit den beschriebenen Eigenschaften isoliert.

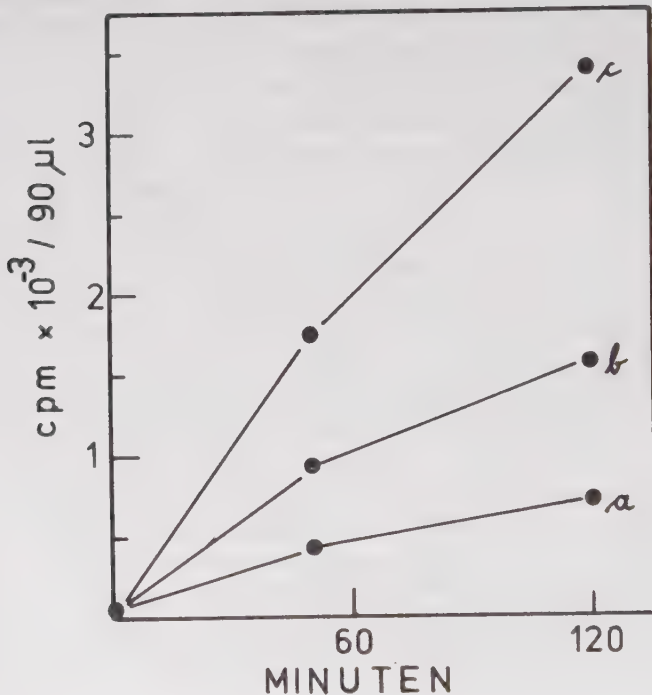


Fig. 7: 150 ml Allantoisflüssigkeit aus $gs^- chf^-$ Eiern wurden wie in der Legende zu Tabelle 4 angegeben, grob gereinigt (Sedimentation, Sedimentation durch 20%ige Saccharose).

Das Material über der 50%igen Rohrzuckerschicht wurde auf ca. 2 ml verdünnt und davon steigende Mengen in Standardpolymerisationsansätze mit dem spezifischen Template-Primer-Komplex $p(C)(dG)_{12}$ eingesetzt. a = 5 μ l/100 μ l Ansatz; b = 10 μ l/100 μ l Ansatz; c = 20 μ l/100 μ l Ansatz. Inkubation erfolgte bei 37°C. Spez. Radioaktivität war 8 Ci/mMol.

Tabelle 4 zeigt die Template-Charakteristik der Reversen Transkriptase aus SPAFAS-Eiern, Figur 7 zeigt den Test der Partikel aus $gs^- chf^-$ SPAFAS-Eiern mit dem spezifischen Template-Primer-Komplex p(C) (dG)₁₂.

Tab. 4: Homopolymer-abhängige Reverse Transkriptase-Aktivität der Partikel aus SPAFAS-Eiern.

Template	Primer	³ H-dNTP	Bedingungen	Einbau cpm/100 μ l x 60 Min
p(C)	-	dGTP	komplett	0
-	(dG) ₁₂	dGTP	"	380
p(C)	(dG) ₁₂	dGTP	"	12 400
p(C)	(dG) ₁₂	dGTP	- Partikel	380
p(C)	(dG) ₁₂	dGTP	- NP 40	1 410
p(C)	(dG) ₁₂	dTTP	komplett	300
p(C)	(dT) ₁₂	dGTP	"	0
p(dC)	(dG) ₁₂	dGTP	"	17 800
p(A)	(dT) ₁₂	dTTP	"	4 530
p(dA)	(dT) ₁₂	dTTP	"	420

Die Allantoisflüssigkeit von ca. 150 SPAFAS-Eiern (10 Tage bebrütet) wurde nach niedertouriger Zentrifugation (Abtrennen von Zellen) in einem Festwinkelrotor ultrazentrifugiert. Das Pellet wurde in wenigen ml STE aufgenommen und in Trockeneis von USA nach Martinsried verschickt. Nach dem Auftauen und einer nochmaligen niedertourigen Zentrifugation wurde das Material durch eine 20%ige Rohrzuckerschicht auf ein 50%iges Kissen zentrifugiert (SW 27.1, 26 000 Upm, 90 min, 4°C). Das Material direkt über der 50%igen Rohrzuckerschicht wurde abgenommen und mit STE auf 2.7 ml verdünnt. Es hatte dann eine Proteinkonzentration von 0.7 mg/ml. Auf eine weitere Reinigung wurde verzichtet und jeweils 10 μ l wurden in Standardreaktionsansätze unter den in der Tabelle angegebenen Bedingungen gebracht. Die Template-Primer-Konzentration betrug 1 μ g/100 μ l, die spez. Radioaktivität der verwendeten Deoxynukleosidtriphosphate 8 Ci/mMol. Nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C wurde der Einbau in säureunlösliches Material bestimmt. Ein Backgroundwert von 300 cpm wurde abgezogen.

Man erkennt aus Tabelle 4 und Figur 7, daß die beiden getesteten amerikanischen Herden eine partikelgebundene Reverse Transkriptase aufweisen. Der Test der Moosburger Eier brachte das gleiche Ergebnis. Man kann also festhalten, daß die Reverse Transkriptase-tragenden Partikel innerhalb einer Herde in allen Eiern, und außerdem in allen getesteten Herden vorkommen. Es handelt sich somit nicht um einen unregelmäßig auftretenden Satelliten, sondern um einen ubiquitär auftretenden, regelmäßigen Bestandteil bebrüteter Hühnereier.

7. Weitere Charakterisierung der "Partikel" durch Herstellung einer hochgereinigten Präparation

Aus den bisherigen Experimenten geht eindeutig hervor, daß in der Allantoisflüssigkeit bebrüteter Hühnereier eine strukturgebundene ("partikelgebundene") Reverse Transkriptase zu finden ist. Bei der Präparation der Partikel mußte eine andere sedimentierbare Struktur mit einer p(dA)-abhängigen DNA-Polymerase (Polymerase α oder β) abgetrennt werden. Das Ziel der bisherigen Aufarbeitungen war es deshalb (unter anderem), die Reverse Transkriptase-Aktivität frei von der zellulären DNA-Polymeraseaktivität zu präparieren. Die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der beiden Strukturen machen dies möglich (siehe auch Kapitel I,1). Das Ziel der jetzt zu beschreibenden Aufarbeitung war es, zu prüfen, wie gut die Verteilung der Enzymkonzentration im Gradienten mit der Verteilung der Proteinkonzentration in Übereinstimmung zu bringen ist, d.h. ob Partikel frei von anderen Strukturen (ohne Enzym) präpariert werden können. Dazu wurden 2 l Allantoisflüssigkeit aus bebrüteten Eiern isoliert, durch niedrigtourige Zentrifugation von Zellen und Zelldebris befreit, und durch wiederholtes Überschichten, Zentrifugieren und Abnehmen des Überstandes wurden die Partikel auf einer 50%igen Rohrzuckerschicht gesammelt. (Jeder Lauf im Rotor SW 27 dauerte 90 Minuten bei 4°C. Es wurde mit 26 000 Upm zentri-

fugiert.) Gleichzeitig waren 2 Rotoren mit insgesamt 9 Gehängen in Betrieb. Nach dem letzten Lauf wurde wieder der Überstand abgenommen und verworfen. Die Partikel über der 50%-Schicht wurden gesammelt, mit STE verdünnt und auf zwei Stufengradienten überschichtet (SW 27, 2 ml 50%ige Saccharose, 20 ml 20%ige Saccharose). Nach einem siebenstündigen Lauf bei 26 000 Upm wurde wiederum die Schicht über der 50%igen Saccharose abgenommen. Diese Partikelrohfraktion wurde nun einer Folge verschiedener Zentrifugationen ausgesetzt und dabei jeweils die Verteilung der Enzymkonzentrationen und der Proteinkonzentration bestimmt. Es folgten aufeinander: 1.) kurzzeitige Bandsedimentation, 2.) Dichtegradientenzentrifugation, 3.) lange Bandsedimentation, 4.) Dichtegradientenzentrifugation.

Aus Figur 8 - 11 wird ersichtlich, daß mit fortschreitender Reinigung die Übereinstimmung zwischen Enzymkonzentration und Verteilung der Proteinkonzentration ständig verbessert wird. Dabei steigt natürlich auch die spezifische Aktivität des Materials an. Nach dem zweiten Dichtegradienten wird eine fast reine Partikelpräparation erhalten. In den Fig. 8 - 11 sind jeweils Enzymkonzentration (Enzymaktivität/10 µl der jeweiligen Fraktion) gegen Proteinkonzentration (mg Protein/ml) aufgetragen. Die Relation der beiden Größen in der graphischen Darstellung wurde dabei konstantgehalten, um die Betrachtung zu erleichtern. Die Betrachtung der Figuren 8 - 11 und der Tabelle 5 zeigt, daß allein durch eine Kombination verschiedener Zentrifugationstechniken eine sehr starke Anreicherung der partikelgebundenen Reversen Transkriptase erreicht werden kann (Anreicherungsfaktor 5000-fach). Die hier geschilderte Aufarbeitung glänzt nicht durch eine gute Ausbeute. Wesentliche Gründe dafür sind die lange Dauer der Aufarbeitung, bedingt durch die Dichtegradientenzentrifugation und der starke Verlust an Material durch die durchgeführten Messungen!

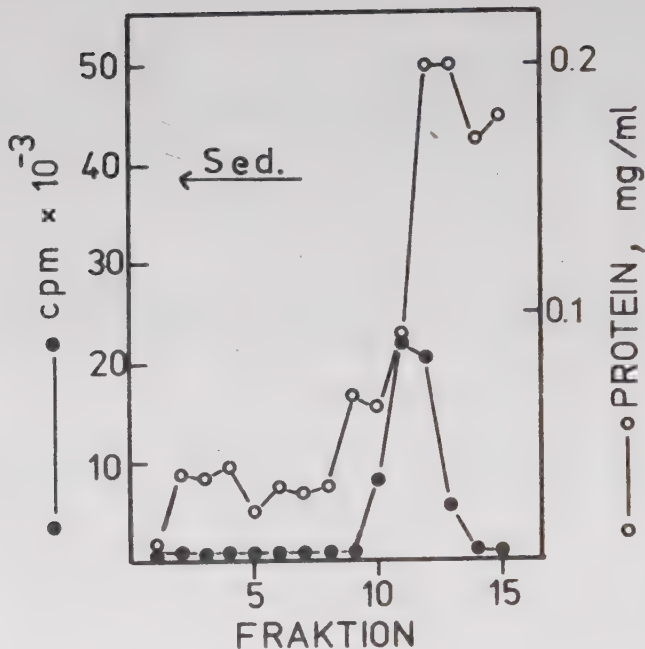


Fig. 8: Kurzzeitige Bandsedimentation der Partikelrohfraktion.

Eine Partikelrohfraktion wurde, wie im Text beschrieben, aus 2 l Allantoisflüssigkeit durch Sedimentation auf ein Kissen und Sedimentation durch 20%ige Saccharose gewonnen. Jeweils 9 ml dieser Rohfraktion wurden auf 2 kontinuierliche Saccharosegradienten im Rotor SW 27 überschichtet (28 ml 20-35%ige Saccharose in STE) und für 50 Minuten bei 26 000 Upm und 4°C zentrifugiert. Die Abnahme erfolgte in je 15 Fraktionen à 2.5 ml. Von jeder Fraktion wurden 10 μ l in einem einstündigen Standardreaktionsansatz mit p(C)(dG)₁₂ auf Reverse Transkriptaseaktivität getestet und die Proteinkonzentration jeder Fraktion wurde gemessen.

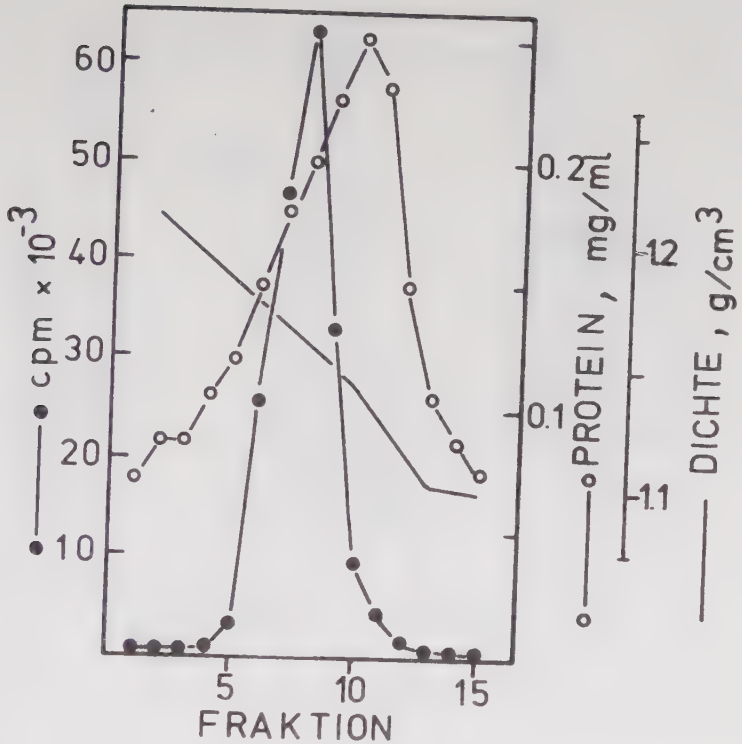


Fig. 9: 1. Dichtegradientenzentrifugation der Partikel.

Die im Enzymtest aktiven Fraktionen der beiden Sedimentationsgradienten wurden vereinigt, mit STE verdünnt, und auf einen kontinuierlichen Rohrzuckergradienten im Rotor SW 27 überschichtet (16 ml 25-50%ige Saccharose in STE). Nach 14 Stunden Lauf bei 26 000 Upm bei 4°C wurde der Gradient fraktioniert (15 Fraktionen à 1.4 ml von unten abgenommen, der Rest verworfen). Bestimmung der Enzymaktivität und der Proteinkonzentration erfolgte wie bei Fig. 8 beschrieben. Die Dichte der einzelnen Fraktionen wurde durch Refraktionsmessung bestimmt.

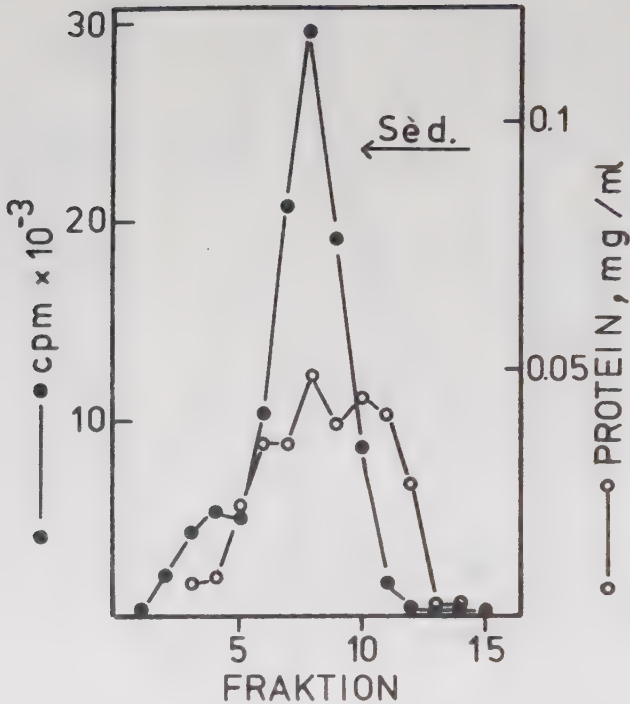


Fig. 10: Lange Bandsedimentation der Partikel.

Die Fraktionen 5 - 11 des vorhergehenden Dichtegradienten wurden mit STE-Puffer auf 35 ml verdünnt und auf 2.5 ml 50%ige Saccharose im Rotor SW 27 überschichtet. Nach 3 Stunden Zentrifugation bei 26 000 Upm, 4°C wurde die Partikelschicht über der 50%igen Saccharoseschicht abgenommen und mit STE auf 6 ml verdünnt. Dieses Material wurde auf einen kontinuierlichen Gradienten (20-35% Saccharose überschichtet und für 210 Minuten bei 4°C mit 26 000 Upm zentrifugiert. Abnahme erfolgte wieder von unten (17 Fraktionen à 2 ml). Enzymtest und Proteinbestimmung wie vorher beschrieben.

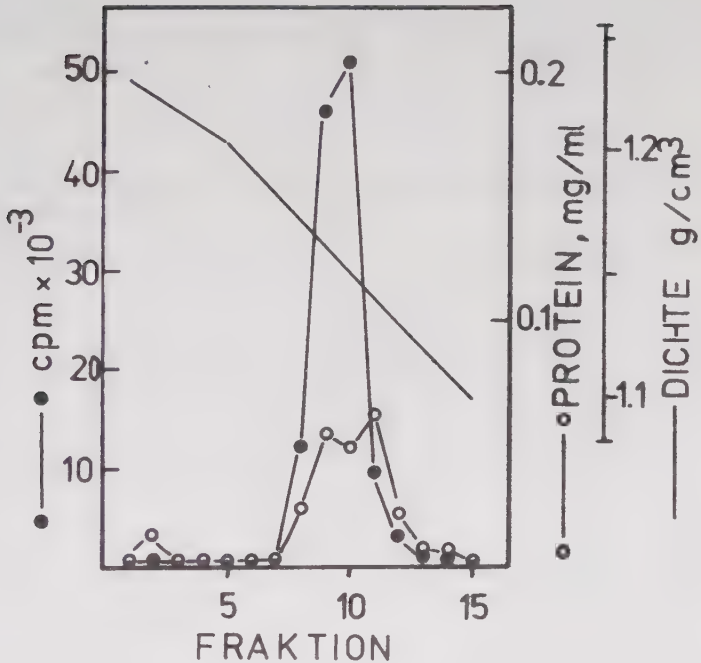


Fig. 11: 2. Dichtegradientenzentrifugation der Partikel.

Die Fraktionen 6,7,8 des vorhergehenden Sedimentationsgradienten wurden vereinigt, mit STE verdünnt und auf einen kontinuierlichen Saccharosegradienten überschichtet (SW 27.1, 8 ml 25-50%ige Saccharose). Zentrifugation bei 4°C erfolgte für 16 Stunden und 26 000 Upm. Der Gradient wurde in 16 Fraktionen à 0.6 ml abgenommen und wie vorher beschrieben, wurden Enzymaktivität, Proteinkonzentration und Dichte bestimmt. Die Enzymkonzentration ist wie in den vorhergehenden Abbildungen als Einbau von ^3H -dGMP (8 Ci/mMol)/20 μl jeder Fraktion in einem Standardansatz mit $\text{p(C)}(\text{dG})_{12}$ von 100 μl bei einstündiger Inkubation (37°C) angegeben.

Tabelle 5 gibt einen Überblick über die in diesem Kapitel beschriebene Reinigung von Partikeln.

Tab. 5: Überblick über die einzelnen Schritte bei der Präparation hochgereinigter Partikel. (AF = Anreicherungsfaktor)

Stufe	Gesamtprotein- menge (µg)	Gesamtaktivität pMol dGMP-Einbau pro 60 Min	spezif. Aktivität pMol/60 Min x µg	Ausbeute %	AF
Allantois- flüssigkeit	4 000 000	8 924	0.0022	100	-
Rohfraktion nach Stufen- gradient	7 700	8 924	1.15	100	522
Peakfraktionen des 1. Sed.- Gradienten	2 600	5 607	2.15	62	977
Peakfraktionen des 1. Dichte- Gradienten	1 890	5 226	2.76	58	1 254
Fraktion 6,7,8 des 2. Sed.- Gradienten	238	2 412	10.13	27	4 604
2. Dichtegradient:					
Frakt. 8	33	152	4.6	$\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 14.2 \\ 7 \end{array} \right.$	2 090
9	48	556	11.5		5 227
10	46	617	12.8		5 818

Das Material der hier beschriebenen Reinigung wurde zur Bestimmung der physikalischen Kenngrößen der Partikel, für proteinchemische Untersuchungen und für die Elektronenmikroskopie herangezogen. Neben dem zeitlichen Aufwand für diese Reinigung ist auch der maschinelle Aufwand bemerkenswert: Um bis zur letzten Stufe zu gelangen waren etwa 100 Millionen Rotorumdrehungen notwendig.

8. Vergleichende Untersuchungen von Partikeln und Hühner-RNA-Tumroviren

a) Physikalische Eigenschaften

Da bisher Reverse Transkriptase nur in Verbindung mit RNA-Tumroviren (oder ähnlichen Virusgruppen) entdeckt worden war (siehe Einleitung), stellte sich natürlich die Frage, ob es sich bei den "Partikeln" aus der Allantoisflüssigkeit uninfizierter Hühnererler um Mitglieder dieser Gruppe(n) handeln könnte. Deshalb wurden die Eigenschaften der Partikel mit denen der bekannten Hühner-RNA-Tumroviren verglichen. (Spätere Untersuchungen verglichen dann das isolierte Enzym aus Partikeln mit den isolierten Enzymen aus Hühner-RNA-Tumroviren.)

Zunächst wurden die physikalischen Eigenschaften verglichen. Wie die Figuren 2,9 und 11 zeigen, bandieren die Partikel in Rohrzuckergradienten bei einer Dichte von $1.15 - 1.16 \text{ g/cm}^3$. Dies ist ein Dichtebereich, der auch (aber nicht ausschließlich) für RNA-Tumroviren typisch ist. D.h., daß auf der Grundlage der Schwimmdichte keine Unterscheidung zwischen Partikeln und RNA-Tumroviren möglich ist.

Bereits in den ersten Experimenten hatte sich gezeigt, daß partikelgebundene Reverse Transkriptase im Innern der Partikel befindlich ist, und daß die Hülle zerstört werden muß, um die Aktivität messen zu können. Dafür hatte sich das nicht-ionische Detergenz NP 40 als geeignet erwiesen. In parallelen Experimenten wurde nun für Partikel und für AMV

(Hühnerleukosevirus, einem repräsentativen Vertreter der ALV/ASV-Gruppe) die Abhängigkeit der von exogenem Template gesteuerten Reaktion von der Konzentration an Detergenz gemessen. Wie Figur 12 zeigt, ergeben sich fast identische Abhängigkeiten. Diese Übereinstimmung in der Festigkeit der Hüllen ist nicht erstaunlich, wenn man sich vorstellt, daß die Partikel möglicherweise ebenso wie die Hühner-RNA-Tumoviren von Zellmembran umgeben sind, die sie beim Ausschleusen aus der Zelle erworben haben.

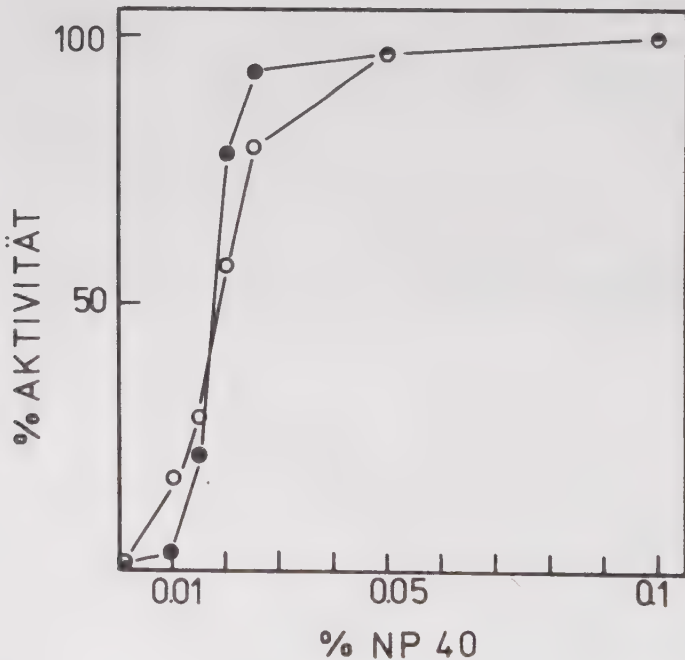


Fig. 12: Abhängigkeit der Reaktion mit exogener Template von der Konzentration an NP 40.

Standardreaktionsansätze mit $p(C)(dG)_{12}$ und 3H -dGTP wurden mit gereinigten Partikeln bzw. gereinigtem AMV in Gegenwart der angegebenen NP 40 Konzentrationen bei $37^\circ C$ inkubiert und der Einbau von 3H -dGMP in säureunlösliches Material in Form von Kinetiken ermittelt. Der größte Anstieg wurde jeweils als 100% angesetzt.

●—● Partikel; ○—○ AMV.

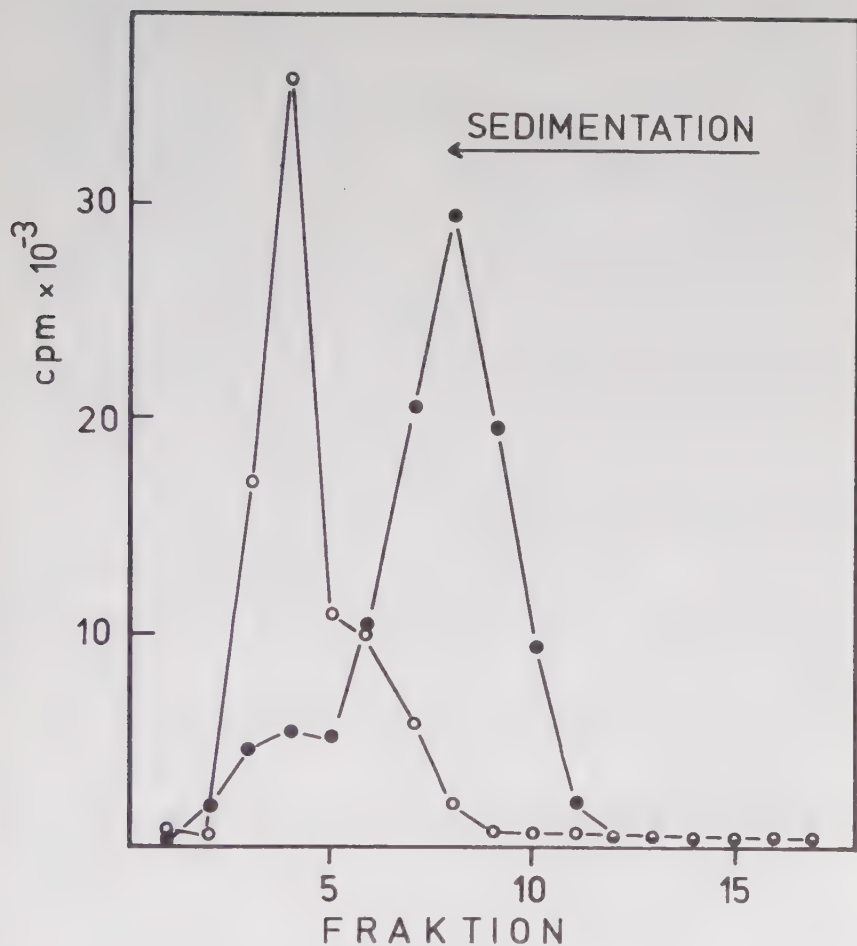


Fig. 13: Sedimentationsanalyse der Partikel.

Gereinigte Partikel wurden auf einen kontinuierlichen Rohrzuckergradienten (20-35%, in STE) im Rotor SW 27.1 überschichtet und bei 26 000 Upm für 210 Minuten bei 4°C zentrifugiert. In einem identischen Parallelgradienten lief AMV unter den gleichen Bedingungen. Die Gradienten wurden fraktioniert und die Position von Partikeln oder AMV durch Test auf Reverse Transkriptase ermittelt. Angegeben sind der Einbau pro Stunde in einem Standardreaktionsansatz mit 20 µl jeder Fraktion des Partikelgradienten.

●—● Partikel; ○—○ AMV.

Als weitere physikalische Kenngrößen wurden die Sedimentationskonstanten von Partikeln und AMV miteinander verglichen. In parallelen Rohrzuckergradienten wurde eine Bandsedimentation durchgeführt. Die Position der Partikel bzw. der Viren wurde nach dem Fraktionieren durch Reverse Transkriptase-Tests bestimmt. Durch Messung der Refraktion der einzelnen Fraktionen wurde überprüft, ob beide Gradienten die gleiche Steigung hatten. Dies war der Fall, so daß die in Figur 13 gezeigten Positionsunterschiede von unterschiedlichen Sedimentationskonstanten herrühren müssen. Im Vergleich zu dem für AMV bekannten Wert von 680 S kann aus dem Experiment ein Wert von ca. 480 S für die Partikel ermittelt werden, d.h., Partikel und Hühner-RNA-Tumoviren unterscheiden sich deutlich in ihrer Sedimentationskonstante.

b) Biologische Eigenschaften

Wie in der Einleitung ausgeführt wurde, lassen sich die Mitglieder der Gruppe der ALV/ASV durch zwei biologische Eigenschaften, nämlich Helferaktivität und Interferenz nachweisen. Aus mehreren Eiern (SPF-Valo, Cuxhaven) wurde die Allantoisflüssigkeit steril entnommen, gemischt und in zwei Teile geteilt. Der erste Teil wurde daraufhin untersucht, ob tatsächlich Partikel mit Reverser Transkriptase nachzuweisen waren, was erwartungsgemäß der Fall war. Mit dem zweiten Teil führte Prof. R. P. Friis, Universität Giessen, die biologischen Kontrollen durch. Da das Ergebnis für die weitere Diskussion von wesentlicher Bedeutung ist, möchte ich seine Experimente im Detail darstellen.

Test auf Helferaktivität:

Embryonale Hühnerfibroblasten (Genotyp C/OE₁) wurden in parallelen Ansätzen mit 0.1 ml einer Verdünnung von RAV-1, bzw. 0.1 ml Allantoisflüssigkeit zusammengebracht, so daß bei Anwesenheit von ALV/ASV Infektion stattfinden konnte. Diese (möglicherweise) vorinfizierten Zellen wurden nun

mit Wachtelzellen, die ein replikationsdefektes Sarkomvirus (BH-RSV, Defekt im Gen "env") produzieren, zusammengebracht und für 5 Tage inkubiert (37°C). Anschließend wurden die Zellen durch Ultraschall voneinander gelöst und auf normale Wachtelfibroblasten plattiert. Es wurde überprüft, ob sich nach einiger Zeit "Foci", d.h. Ansammlungen transformierter Zellen bildeten. Focusbildung innerhalb von wenigen Tagen kann nur stattfinden, wenn das defekte Sarkomvirus komplementiert wurde. Damit ist die Focusbildung ein Nachweis von ALV/ASV mit funktionsfähigem "env". Für die Verwendung von defektem BH-RSV aus Wachtelzellen spricht die Tatsache, daß Wachtelzellen 100% chf⁻ sind, d.h. den Defekt sicher nicht komplementieren können.

Tab. 6: Test auf Helferaktivität (ALV/ASV mit nichtdefektem Gen "env") in der Allantoisflüssigkeit.

defektes Sarkomvirus	"Vorinfektion" der Hühnerzellen mit	FFU/ml
BH-RSV	-	0
BH-RSV	PAV-1	8×10^4
BH-RSV	Allantoisflüssig- keit	0

Das Experiment wurde wie im Text beschrieben, durchgeführt.
FFU/ml = Focus forming unit/ml.

Bei gutfunktionierender Kontrolle (PAV-1) zeigt sich keine Focusbildung bei dem Experiment mit Allantoisflüssigkeit. Damit ist gezeigt, daß weniger als 1 infektiöses, nicht-defektes ASV oder ALV/0.1 ml Flüssigkeit vorliegt. D.h., eine Präparation die mit 2 l Allantoisflüssigkeit beginnt, enthält sicher weniger als 2×10^4 infektiöse ALV/ASV. Um die auftretende Reverse Transkriptaseaktivität durch die Anwesenheit von ASV/ALV erklären zu wollen, würde man jedoch 6×10^9 Viren in der gleichen Menge Flüssigkeit vor- aussetzen müssen.

(Berechnung dieses Wertes:

Gereinigt AMV baut im Standardtest 1000 pMol/ μ g x 60 min ein. 2 l Allantoisflüssigkeit besitzen eine Gesamt-Reverse-Transkriptaseaktivität von ca. 9000 pMol/60 min. 9 μ g AMV könnten die gleiche Syntheseleistung vollbringen, 9 μ g sind etwa 6×10^9 Virusteilchen.)

Nachdem gezeigt war, daß innerhalb der Nachweisgrenze keine Helferaktivität nachzuweisen war, wurde die zweite biologische Kontrolle, der Interferenztest durchgeführt. Der Test basiert auf der Tatsache, daß die Hühnerzellen nur eine begrenzte Anzahl von Rezeptoren für die verschiedenen Untergruppen von Viren besitzen. Wenn nun mit Leukoseviren einer bestimmten Untergruppe vorinfiziert wird, kann eine spätere Infektion durch ein Virus der gleichen Untergruppe nicht mehr stattfinden. Wenn man als "Indikatorvirus" bei der Überinfektion ein nichtdefektes Sarkomvirus verwendet, so zeigt ein Ausbleiben der Focusbildung die Anwesenheit von Leukoseviren an. (Die Leukoseviren selbst würden auf Fibroblasten keine Foci bilden können, d.h. direkt nicht "sichtbar" gemacht werden können.)

Die Ergebnisse der biologischen Kontrollen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Die getestete Allantoisflüssigkeit enthält keine infektiösfähigen Hühner-Sarkom oder Hühnerleukoseviren (ASV/ALV). Der Test auf Helferaktivität schließt die Untergruppen A-E, und formal auch die nur bei Fasanen vorkommenden Leukoseviren der Untergruppen F und G aus. Durch den Interferenztest werden die Untergruppen A-D ausgeschlossen. Anwesenheit von REV (das defektes ASV nicht komplementieren kann) hätte zu sichtbaren cythopathischen Effekten geführt, so daß die Anwesenheit infektiöser Mitglieder dieser Gruppe durch die Ergebnisse der durchgeführten Tests indirekt ausgeschlossen werden kann.

Tabelle 7 zeigt das Ergebnis des Interferenztestes mit Allantoisflüssigkeit.

Tab. 7: Interferenztest

Interferierendes Virus bzw. Testlsg.,		-	Allant.- flüssigk.	RAV-1	RAV-2	RAV-49	RAV-50
Untergruppe				A	B	C	D
"Indikator-virus"	Untergruppe						
SR-A	A	+++	+++	O	++	+++	+++
SR-B	B	+++	+++	+++	O	+++	O
B77	C	+++	+++	+++	++	O	+++
SR-D	D	+++	+++	+++	+	+++	O
-		O	O	O	O	O	O

Embryonale Hühnerzellen wurden mit den zu testenden Lösungen zusammengebracht, weitergezüchtet, und nach 2 Passagen (jeweils nach 5 Tagen) in den Testplatten mit den Indikator-Sarkomviren zusammengebracht. Nach 6 Tagen wurde die Anzahl der Foci bestimmt. +++ = konfluente Transformation; ++ = 100 Foci, + = >1 aber <10 Foci, O = keine Foci. Die Erläuterung der Abkürzungen findet sich in der Abkürzungsliste zu Beginn der Arbeit.

c) Proteinzusammensetzung

Da die beiden Gruppen von Hühner-RNA-Tumoviren jeweils ein für die Gruppe typisches und konstantes Proteilmuster zeigen, sollte die Analyse der Proteinzusammensetzung der Partikel Auskunft über eine mögliche Verwandtschaft der Partikeln zu einer der beiden Virusgruppen geben. Zur vergleichenden Analyse wurde die Methode der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (nach Laemmli) verwendet. Bei dieser Technik werden die Proteine entsprechend ihrer Molekulargewichte aufgetrennt. Die technische Durchführung wird im Methodenteil beschrieben.

Da die Konzentrationen an Partikelprotein zu gering waren, um Phenolisierung und Fällungen durchführen zu können, wurden die Partikel aus der Lösung sedimentiert und das (oft unsichtbare Pellet) direkt in Elektrophoresepuffer aufgenommen und für einige Minuten bei 85°C erhitzt. Die für den Vergleich verwendeten Viren (AMV und REV) wurden auf die gleiche Art und Weise aufbereitet.

Das erste Bild zeigt das Proteinmuster der Partikel verschiedener Reinigungsstufen, im Vergleich zu den Proteinen von AMV. Man erkennt deutlich, daß mit zunehmender Reinigung vor allem eine Komponente bei 45 000 relativ zunimmt. Das Muster der letzten Reinigungsstufe (Partikel nach Dichtegradientenzentrifugation) ist deutlich verschieden von dem Muster der AMV-Proteine. Während es sich bei den in Bild 1 analysierten Partikeln um eine Präparation aus Cuxhavener SPF-Valo-Eiern handelt, ist auf dem nächsten Bild (Nr. 2) das Proteinmuster der Partikel aus amerikanischen SPAFAS-Eiern zu sehen. Bild 3 zeigt schließlich den Vergleich der Partikelproteine (Cuxhavener Eier) mit AMV-Proteinen und REV-Proteinen. Die Proteinmenge pro Gelspur ist dabei so eingestellt, daß nur die Hauptstrukturkomponenten zu sehen sind. Es zeigt sich, daß REV und AMV voneinander verschieden sind (wie in der Literatur beschrieben), und daß die Partikel ein von beiden Viren verschiedenes Bild ergeben. Bild 4 zeigt, daß nach weiterer Reinigung der Partikel das bisher ermittelte Bild im wesentlichen von Bestand ist.

Von den meisten Präparationen wurde eine Proteinanalyse durchgeführt. Um das Molekulargewicht der bei allen Analysen auftretenden Proteinbanden genau zu bestimmen, wurde die Laufstrecke der einzelnen Banden gemessen und in ein Diagramm eingetragen, in dem der Logarithmus der Molekulargewichte der Eichproteine gegen die jeweilige Laufstrecke eingezeichnet war. Diese Auswertung zielte darauf,

zu ermitteln, an welcher Stelle in fast allen Präparationen Banden auftreten, und das Molekulargewicht dieser Banden durch Vergleich mit den Eichproteinen zu ermitteln. Die verschiedenen Stärken der Banden wurden durch verschieden hohe Striche zum Ausdruck gebracht, jedoch ohne den Anspruch darauf, eine quantitative Analyse durchführen zu wollen. Zum Vergleich wurden die Positionen der AMV-Proteine und in zwei Fällen die Positionen der REV-Proteine eingetragen.

Die folgenden Figuren 14 - 20 zeigen die graphische Auswertung der vergleichenden Proteinanalysen. Die in Figur 14 - 19 analysierten Partikel waren bis einschließlich der Stufe des ersten Dichtegradienten gereinigt. Bei Figur 20 handelt es sich um Proteine der in Kap.I,7 beschriebenen hochgereinigten Fraktion, die auch in Bild 4 dargestellt ist.

Aus den graphischen Analysen wurden als regelmäßige Bestandteile der Partikel Proteine mit den Molekulargewichten 45 000, 35 800 und 17 600 Dalton ermittelt. Über die Zugehörigkeit weiterer Banden (im Molekulargewichtsbereich über 60 000 Dalton) zum Partikel konnte keine Klarheit erhalten werden.

Auffallenderweise zeigt sich in einigen Präparationen von AMV und auch von REV eine mehr oder weniger deutliche Bande bei 45 000. Allerdings findet sich in der Literatur kein Hinweis auf Proteine dieser Größe in den Hühner-RNA-Tumoviren. Zwei interessante Spekulationen bieten sich an (unter der Annahme, daß es sich um die gleichen Proteine in der Viruspräparation und den Partikeln handelt, was durch die Gelanalyse allein nicht zwingend ist): a) Partikel kommen als "Kontamination" in den Viruspräparationen vor; b) bei der Hauptstrukturkomponente handelt es sich um ein Protein der Hühnerzelle (Membran?), das auch von den Viren beim Ausschleusvorgang mitgenommen werden kann.

Auf alle Fälle zeigt sich aber, daß die Hauptstrukturkomponenten der beiden Gruppen von Hühner-RNA-Tumoviren nicht in den Partikeln vorkommen. Diese Aussage wurde durch ein Kontrollexperiment, das Dr. A. Vaheri (Universität Helsinki) durchführte,

untermauert: Partikel, die in einen Radio-immuneassay zum Nachweis der Hauptkomponente der ASV/ALV (p 27 = protein mit dem Mol.Gew. 27 000) eingesetzt wurden, ergaben kein Anzeichen einer positiven Reaktion. Wurde AMV zu der Partikelprobe zugegeben (wobei die Polymeraseaktivität der Viren den gleichen Wert hatte wie die Partikel), dann war ein deutlicher Nachweis von p 27 möglich. Das zeigt, daß die ausbleibende Reaktion bei der Analyse der Partikel nicht durch Störung des Testes hervorgerufen wird, sondern durch das Fehlen des viralen Proteins in den Partikeln.

d) Morphologische Eigenschaften

Zur morphologischen Untersuchung wurden gereinigte Partikel mit Uranylformiat kontrastiert und im Elektronenmikroskop betrachtet. Als Vergleich diente AMV, das gleichbehandelt war.

Die Untersuchungen befinden sich noch in einer frühen Phase und lassen bisher wenig Schlüsse zu. Deutlich ist lediglich, daß die Partikel als heterogene Population bezüglich der Größe erscheinen (50-250 nm), während AMV homogen erscheint (90 nm).

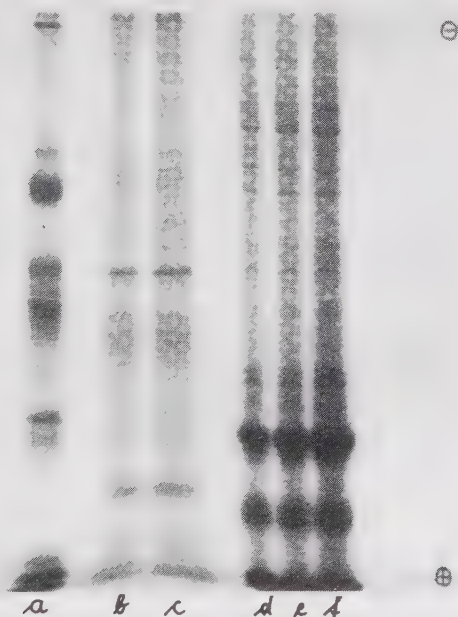
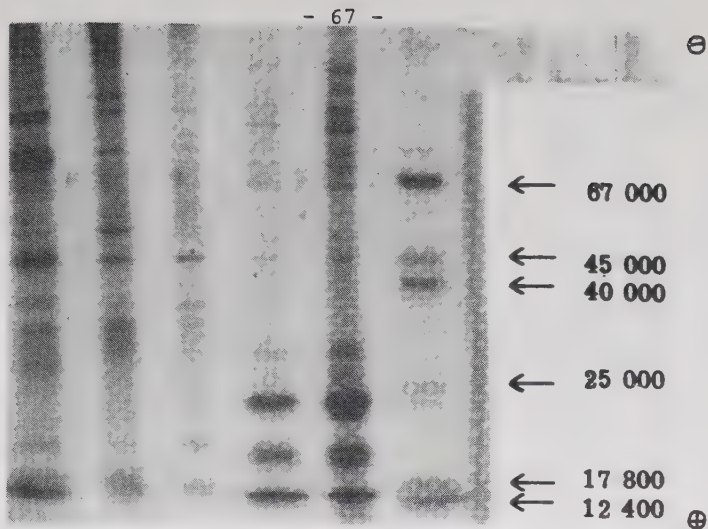


Bild 1: Polyacrylamidgelelektrophorese verschiedener Reinigungsstufen von Partikeln, im Vergleich zu AMV und Molekulargewichtsmarkern.
a - c = Partikel (a) Resusp., b) nach Stuf. Grad., c) nach 1. Dichtelauf); d, e = AMV, f = Molekulargewichtsmarker.

Bild 2: Polyacrylamidgelelektrophorese von Partikeln aus SPAFAS-Eiern (USA).
a = Molekulargewichtsmarker; b, c = Partikel; d, e, f = AMV.

67 000
60 000
45 000
40 000

25 000

17 800
12 400

a b c d e f g

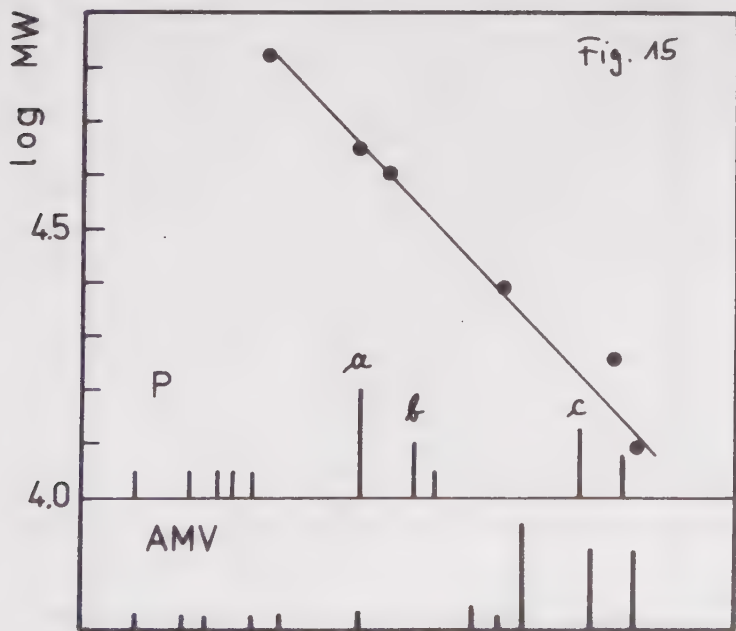
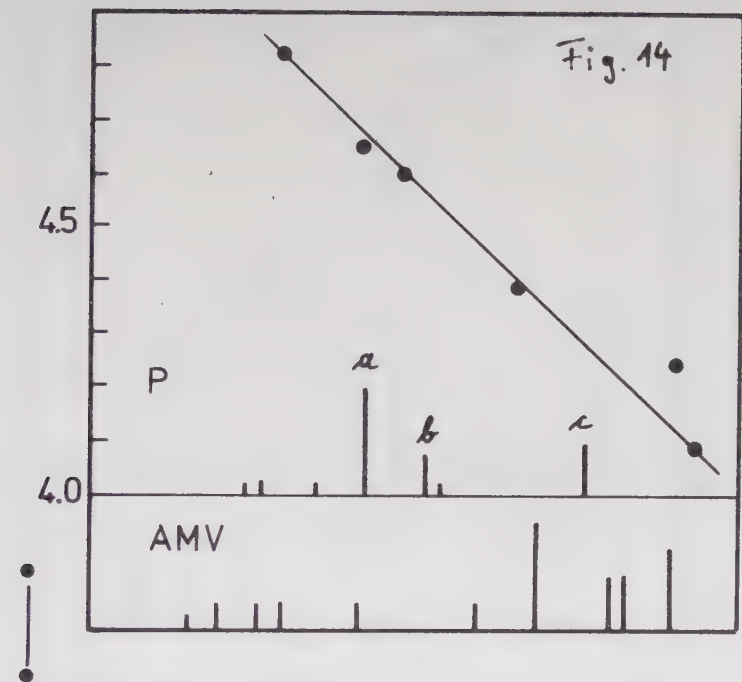
Bild 3

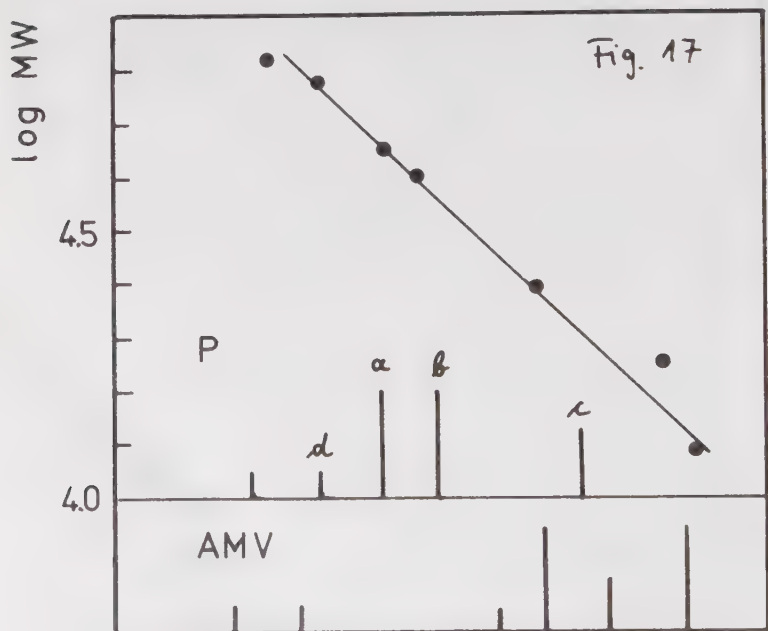
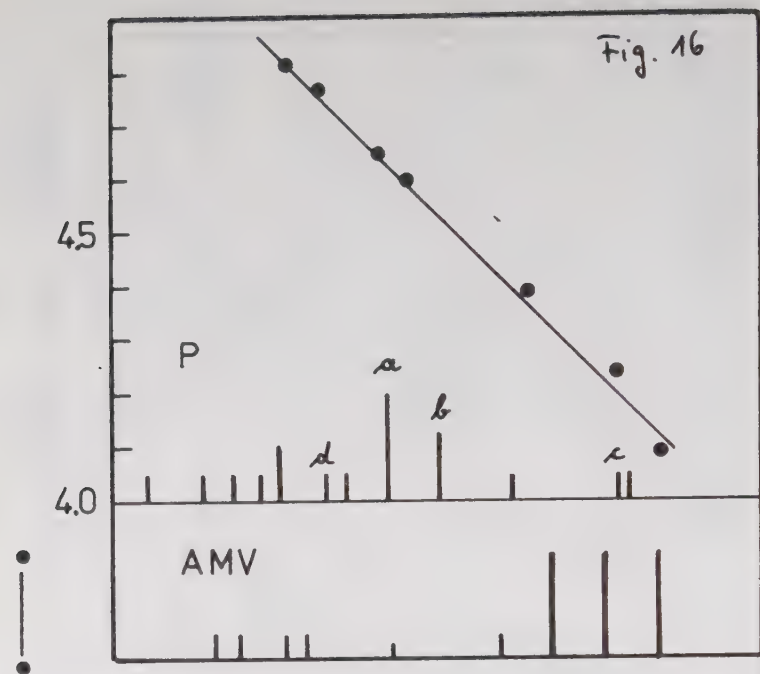
a b c d e f g h

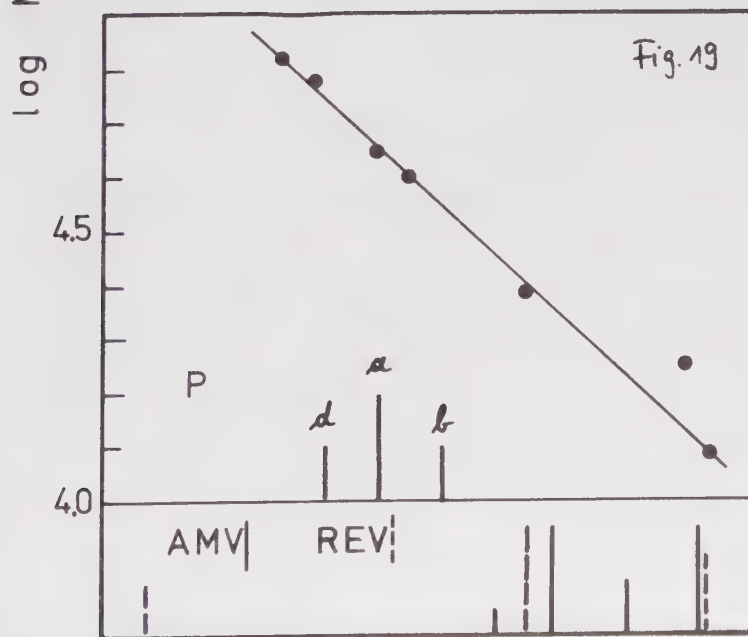
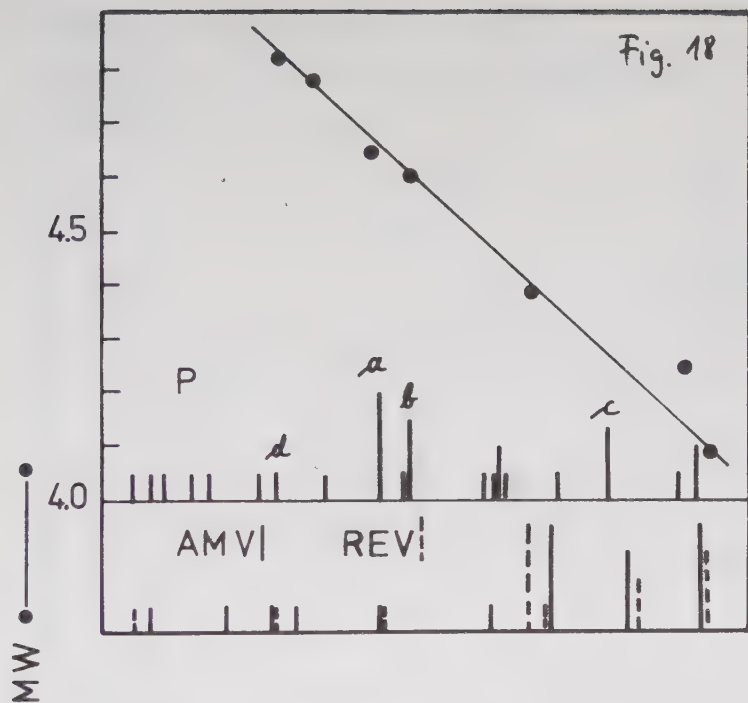
Bild 4

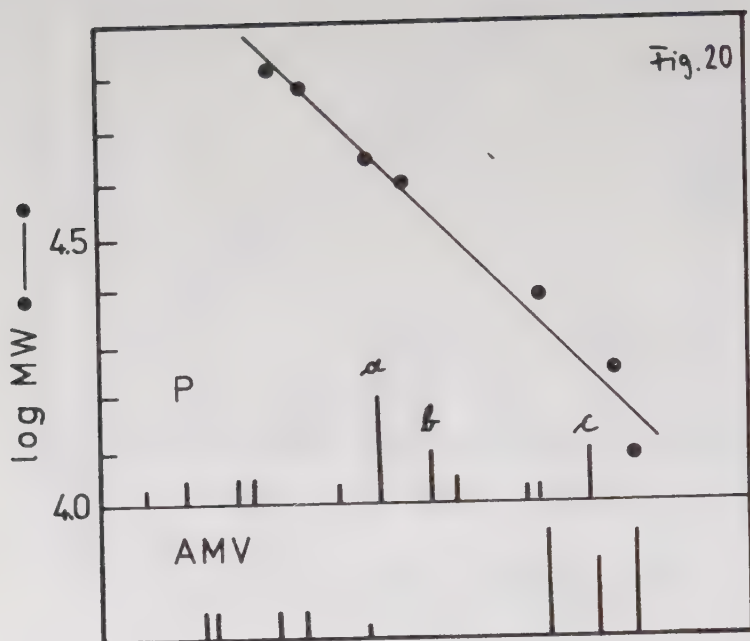
Bild 3: Polyacrylamidgelelektrophorese von Partikeln, AMV und REV.
a = Molekulargewichtsmarker; b, c = REV (verschiedene Reinheitsgrade); d = gereinigte Partikel; e, f, g = AMV (verschiedene Mengen).

Bild 4: Polyacrylamidgelelektrophorese hochgereinigter Partikel.
a = Marker; b = AMV; c = Partikel nach Stufengradient; d, e, f = Partikel nach 2. Dichtegradient (siehe S. 54, 55). Dabei stammt d) aus dem mittleren, e) aus dem vorderen, f) aus dem hinteren Teil des Sedimentationsgradienten (S. 54), und wurde durch einen weiteren Dichtegradienten gereinigt. Davon wurde jeweils die Peakfraktion pelletiert und auf das Gel gegeben. g = Material aus den hinteren Fraktionen des 1. Dichtegradienten (S. 53) mit erheblicher Proteinkonzentration aber ohne Enzymaktivität; h = Marker.









Legende zu den Figuren 1- - 20:

Bestimmung der Molekulargewichte der Partikelproteine und Vergleich mit den Proteinen von AMV bzw. REV.

Die Position der Markerproteine wurde ermittelt und gegen den Logarithmus ihres Molekulargewichtes aufgetragen. Zur Standardisierung der Diagramme wurden die verschieden langen Laufstrecken graphisch aneinander angeglichen, indem die Position des Markers 45 000 als 5 cm (in der Abbildung) festgelegt wurde, und die übrigen Strecken dementsprechend proportional verkürzt oder verlängert wurden. Die Position der Banden der Partikel, bzw. der Vergleichsviren wurde durch Ausmessen bestimmt und eingetragen. Die Strichhöhe gibt ungefähr die relative Stärke der einzelnen Banden wieder. Die Partikel stammen aus verschiedenen Präparationen und sind in der Regel bis einschließlich Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. In Figur 20 wurden die Proteine hochgereinigter Partikel analysiert.

II. Charakterisierung des gereinigten Enzyms

1. Reinigung des Enzyms aus der Partikelfraktion

a) Anreicherung der Partikel

Tabelle 8 und 9 geben einen Überblick über die Anreicherung der partikelgebundenen Reversen Transkriptase, allein durch Anreicherung der Partikel. In beiden Fällen war der Reinigungsgang wie in Kapitel 1 beschrieben, nämlich Pelletierung der Partikel aus der von Zellen und Zelldebris befreiten Allantoisflüssigkeit, Resuspendierung der Pellets und kurzzeitige Bandsedimentation, daran anschließend Dichtegradientenzentrifugation. Man erkennt, daß die spezifische Aktivität von Stufe zu Stufe deutlich zunimmt. Der effektivste Schritt dabei ist die erste Pelletierung, bei der etwa 99% der Ausgangsproteinmenge abgetrennt werden können. Eine in den ersten Stufen im Überschuß vorhandene DNA-Polymeraseaktivität, die das Template $p(dA)(dT)_{12}$ verwenden kann, wird durch den Sedimentationsgradienten weitgehend abgereinigt. Man erkennt dies an der Umkehr des Verhältnisses der Aktivitäten mit den Templates $p(A)(dT)_{12} : p(dA)(dT)_{12}$ zugunsten des Wertes für $p(A)(dT)_{12}$. Das Verhältnis stellt sich auf einen konstanten Wert ein, der durch weitere Reinigung nicht verändert werden könnte, denn die nun gemessene $p(dA)$ -abhängige Restaktivität stammt nicht mehr von dem kontaminierenden Enzym (Polymerase α oder β), sondern wird von der Reversen Transkriptase selbst bewirkt. Das in Tabelle 8 aufgeführte Verhältnis der Aktivitäten mit den Templates $p(C)(dG)_{12} : p(A)(dT)_{12}$ verändert sich nicht deshalb, weil eine $p(A)$ -abhängige Polymerase abgetrennt wurde, sondern weil in den ersten Stufen die $p(C)$ -abhängige DNA-Polymeraseaktivität wegen Nuklease-Einwirkung gedämpft gemessen wird. Das RNase-stabile Template $p(A)(dT)_{12}$ gibt hier genauere Werte. Wegen der größeren Spezifität des Templates $p(C)(dG)_{12}$ für Reverse Transkriptasen empfiehlt es sich jedoch trotzdem, die Anreicherung mit diesem Template zu verfolgen. Eine Über-

Tab. 8: Anreicherung der Reversen Transkriptaseaktivität durch Reinigung der Partikel

Stufe (Vol)	Gesamtprotein µg	p(C) (dG) ₁₂	Gesamtaktivität, pMol/60 min p(A) (dT) ₁₂	p(A) (dT) ₁₂	p(dA) (dT) ₁₂	spez. Akt. pMol dTMP/ µg x 60 min	p(C):p(A)	p(A):p(dA)
Allant. (880 ml)	1 760 000		1 847 *			0.001 *		
Resusp. (18.2 ml)	20 020	1 060	1 847	3 292		0.092	0.57	0.56
Stufengr. (7.4 ml)	2 960	1 664	950	1 326		0.320	1.75	0.71
Sed.Gr. (16.1 ml)	662	1 129	712	57		1.075	1.58	12.30
Dichtegr. (Peak) (6.65 ml)	133	476	223	19		1.681	2.12	11.70
Dichtegr. (Fr. 11) (0.95 ml)	19	160	70	5		3.690	2.28	13.0

Anreicherungsfaktor (bezogen auf die Messungen mit p(A) (dT)₁₂ : 3690. Ausbeute: 12%

Allant. = Allantoisflüssigkeit; Resuspend. = Material nach 1. Pelletierung und Resuspendierung;
Stufengr. = Material nach Stufengradient; Sed.Gr. = Material nach kurzzeitiger Bandsedimentation,
Dichtegr. = Dichtegradient. Die mit * gekennzeichneten Werte sind unter der Annahme berechnet,
daß bei der ersten Pelletierung alles Material aus der Allantoisflüssigkeit gewonnen wurde.

p(C) : p(A) : Verhältnis der Aktivitäten mit den Komplexen p(C) (dG)₁₂ : p(A) (dT)₁₂. Entsprechend
p(A) : p(dA).

Tab. 9: Anreicherung der Reverse Transkriptaseaktivität durch Reinigung der Partikel

Stufe	Gesamtprotein µg	Gesamtaktivität mit p(C) (dG) ₁₂ pMol dGMP/60 Min	spez. Aktivität pMol dGMP/ µg x 60 Min	p(A) : p(dA)	Anreicherungsfaktor gegenüber vorher- gehender Stufe
Allant.	3 180 000	2 693 * ²	0.0008 * ²	n.g.	-
Resusp.	24 080	2 693 * ¹	0.11 * ¹	n.g.	137
Stufengr.	3 960	1 451	0.366	0.15	3.32
Sed. Gr. (Fr. 12, 13)	605	1 386	2.25	2.23	6.14
Dichtegr. (Fr. 8, 9)	113	830	7.34	6.0	3.2

Gesamt-Anreicherungsfaktor (bezogen auf Messungen mit p(C) (dG)₁₂ : 9175. Ausbeute: 30.8%

Die Bezeichnungen entsprechen denen der Tabelle 8. n.g. = nicht getestet.

*¹: Die Aktivität wurde wegen des Fehlens durch Nukleasewirkung nicht direkt gemessen, sondern durch Addition der Aktivitäten in den einzelnen Schichten des Stufengradienten ermittelt.

*²: Die Werte sind unter der Annahme berechnet, daß alles sedimentierbare Material aus der Allantoisflüssigkeit gewonnen wurde.

prüfung der Reinigung mit allen drei angeführten Template-Primer-Komplexen ermöglicht bei sorgfältiger Interpretation der Meßergebnisse sowohl quantitative Aussagen, als auch qualitative Aussagen, und zwar bezüglich der Anwesenheit fremder Enzyme und der Anwesenheit von Nuklease. (Selbstverständlich muß stichprobenartig überprüft werden, ob die angereicherte Aktivität Template und Primer benötigt, um nicht auf eine terminale Deoxynukleotidyltransferase hereinzufallen!)

b) Isolation des Enzyms aus der gereinigten Partikelfraktion

Wie in Tabelle 8 und 9 zusammenfassend dargestellt, kann ein partikulär gebundenes Enzym mit den Eigenschaften einer Reversen Transkriptase aus der Allantoisflüssigkeit durch Zentrifugationsmethoden fast 10000-fach angereichert werden. Die Partikelfraktion (20-150 µg Protein/500 Eier) ist weitgehend frei von der zunächst im Überschuß vorhandenen p(dA)-abhängigen DNA-Polymerase (Polymerase α oder β). Um ausgehend von kleinen Proteinmengen das Enzym möglichst verlustfrei aus den Partikeln freizusetzen und zu reinigen, wurde die von Markus et al. (92) beschriebene Methode zur Reinigung von Reverser Transkriptase aus AMV durch Affinitätschromatographie an Poly(C)-Sepharose herangezogen. Da das Partikelenzym p(C) als Template verwendet, war mit großer Wahrscheinlichkeit zu erwarten, daß es sich ebenso wie das AMV-Enzym an Poly(C)-Sepharose binden lassen sollte. Gereinigte Partikel wurden durch Zentrifugation im Festwinkelrotor gesammelt und durch Zugabe von NP 40 (5%) und KCl (0.4 M) aufgeschlossen. Nach Absenken der Ionenstärke auf 0.04 Molar wurde das Material auf eine p(C)-Sepharosesäule aufgetragen. Wie Fig. 21 zeigt, wurde unter den gewählten Bedingungen mehr als 90% der Gesamtaktivität gebunden, während das Gesamtprotein, soweit meßbar, vollständig im Durchlaufvolumen eluiert wird. Damit erweist sich die verwendete Methode als sehr effektiv für die Reinigung des Enzyms in einem Schritt. Ein genauer

Reinigungsfaktor und eine spezifische Aktivität des Enzyms können allerdings nicht angegeben werden, da eine Proteinbestimmung in der gereinigten Fraktion nur unter Aufopferung relativ großer Proteinmengen mit Spezialmethoden möglich wäre.

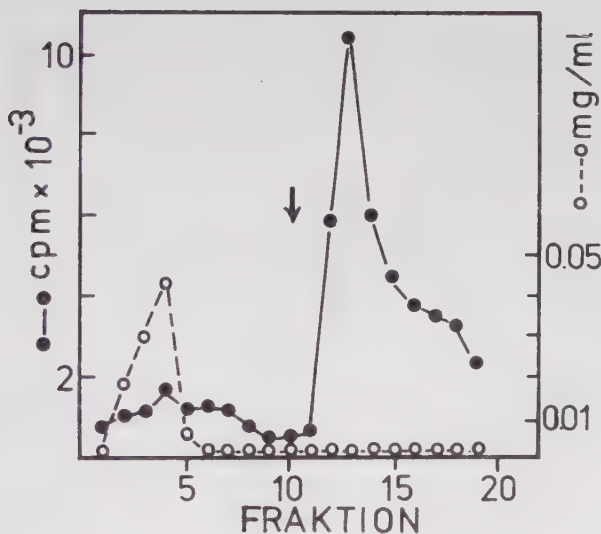


Fig. 21: Affinitätschromatographie an p(C)-Sephrose, zur Reinigung des Partikelenzym.

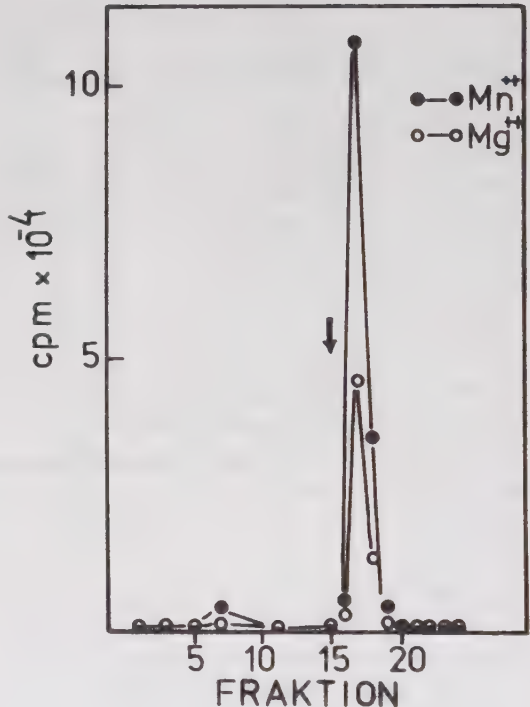
Etwa 50 µg gereinigte Partikel wurden pelletiert und entsprechend der von Markus et al. (1974) (92) beschriebenen Methode weiterverarbeitet. Das Volumen der Säule betrug 0.8 ml, das Volumen der Fraktionen ca. 0.5 ml. Die Flußgeschwindigkeit beim Durchlauf und Waschen (Puffer A = 0.01 M Phosphat, pH 8.0, 1 mM DTE, 10% Glycerin) betrug 5 ml pro Stunde. Die Elution (Puffer A + 0.4 M KCl) erfolgte mit 50 ml/Stunde. Fraktionen 1 - 4 enthalten den Durchlauf, 5 - 10 die Waschflüssigkeit, 11 - 18 das eluierte Enzym. Pro Fraktion wurden 20 µl in einem einstündigen Standardreaktionsansatz mit p(C)(dG)₁₂ als Template-Primer-Komplex inkubiert und die Reverse Transkriptaseaktivität bestimmt. Jeweils 100 µl jeder Fraktion wurden nach Dialyse gegen H₂O zur Proteinbestimmung nach Lowry eingesetzt. ●—● Enzymaktivität, o—o Proteinkonzentration.

2. Reinigung viraler Reverser Transkriptasen für Vergleichszwecke

Die für die später folgenden vergleichenden Untersuchungen benötigten Enzyme aus gereinigtem AMV bzw. REV wurden ebenfalls durch Affinitätschromatographie und wie Fig. 22 für REV zeigt, mit vergleichbarem Ergebnis gereinigt.

Fig. 22: Reinigung von Reverser Transkriptase aus REV.

Gereinigtes REV wurde wie in der Legende zu Fig. 21 beschrieben, behandelt. Der Pfeil gibt den Beginn der Elution mit 0.4 M KCl an. Durchlauf, Waschfraktionen und eluierte Fraktionen wurden mit Standardreaktionsansätzen $p(C)(dG)_{12}$ auf Reverse Transkriptase-Aktivität getestet. Der Test erfolgte a) in Gegenwart von 0.4 mM Mn^{++} und b) in Gegenwart von 10 mM Mg^{++} .



3. Freiheit des gereinigten Partikelenzym von Template

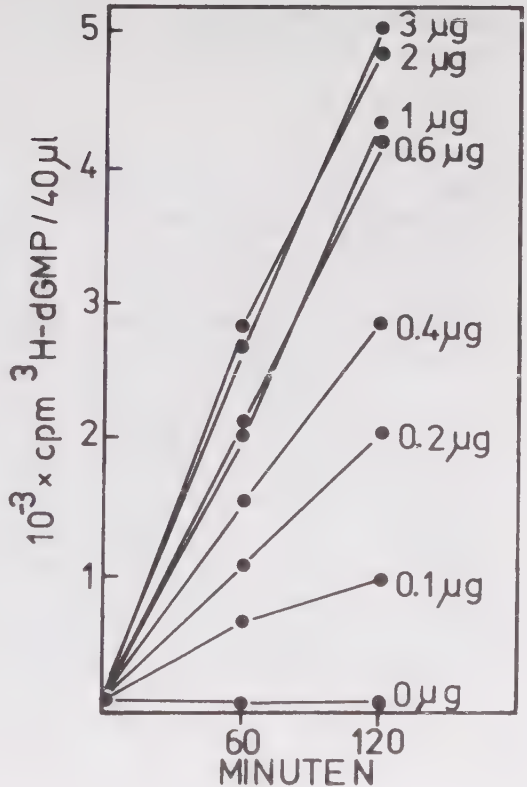
Alle Enzympräparationen wurden auf degradiertes und deshalb eluiertes $p(C)$ ausgetestet, da die unerkannte Anwesenheit einer Template zu Fehlinterpretationen von Ergebnissen führen kann. Nur vollständig $p(C)$ -freie Präparationen, d.h. Präparationen, die nach Zusatz von $(dG)_{12}$ keinen Einbau von 3H -dGMP zeigten, wurden für die weiteren Versuche verwendet.

4. Abhängigkeit der Reverse Transkriptase-Reaktion von der Konzentration an zugesetztem Template-Primer-Komplex

Aus einem gemeinsamen großen Standardreaktionsansatz (ohne Template-Primer) wurden gleichgroße Aliquots auf 8 Röhrchen verteilt (jeweils 190 μ l). Zu den einzelnen Ansätzen wurden nun steigende Mengen des Template-Primer-Komplexes p(C)(dG)₁₂ in einem konstanten Volumen, gegeben. Nach dem Mischen wurde die erste Probe entnommen und der Ansatz bei 37°C weiterinkubiert. Die Entnahme weiterer Proben erfolgte nach 60 Minuten und 120 Minuten. Figur 23 zeigt, daß die Reaktionen zeitlich linear verlaufen und im Bereich der Template-Primer-Konzentration von 0 - 0.6 μ g/200 μ l direkt proportional zur

Fig. 23: Abhängigkeit der Reverse Transkriptase-Reaktion von der Template-Primer-Konzentration.
(Kinetische Messung)

Konstante Mengen gereinigtes Partikelenzym wurden in Standardreaktionsansätze von 200 μ l eingesetzt. Die Ansätze enthielten die angegebenen Mengen p(C)(dG)₁₂. Es handelt sich um ein Präparat von P.L. Biochemicals, mit einem Basenverhältnis C:G = 1:1. Inkubations erfolgte bei 37°C. Zu den angegebenen Zeiten wurden jeweils 40 μ l entnommen und der Einbau von ³H-dGMP in säureunlösliches Material bestimmt.



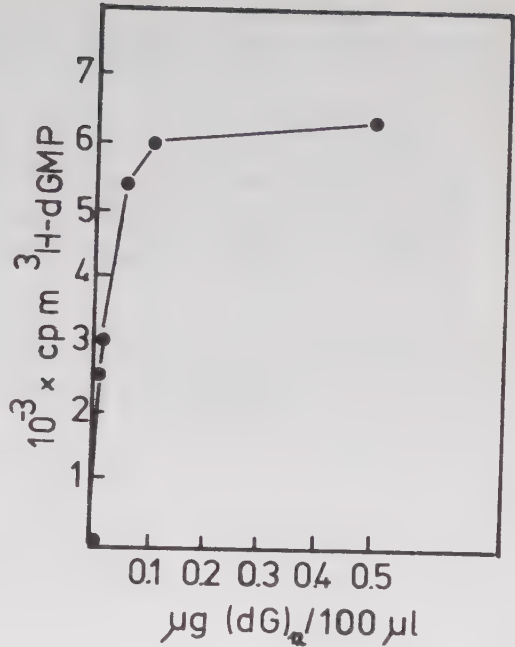
Template-Primer-Konzentration sind. Bei größerer Konzentration tritt allmählich Sättigung ein. Bei dem verwendeten Präparat p(C)(dG)₁₂ handelt es sich um ein Produkt von P.L. Biochemicals, mit einem molaren Verhältnis der Basen von 1:1. In den weiteren Experimenten wurde eine Konzentration von 1 µg Template-Primer/100 µl beibehalten, um im Sättigungsbereich zu arbeiten.

5. Abhängigkeit der Reaktion von der Primer-Konzentration

Die käuflichen Präparate synthetischer Template-Primer-Komplexe enthalten, wie eben erwähnt, Template und Primer in einem Verhältnis von 1:1, bezogen auf die Basen. Unter der Annahme daß alle (kurzen) Primermoleküle Basenpaarung mit dem (langen) Template-Molekül eingehen, gilt, daß das gesamte Template-Molekül mit Primer bedeckt ist. Die an den Komplex bindende Reverse Transkriptase müßte sich demnach erst Platz schaffen, um einen Komplementärstrang synthetisieren zu können. Daher wurde bestimmt, wieviel Primer notwendig ist, um gerade noch eine optimale Reaktion zu erlauben. Zu konstanten Mengen Template (0.5 µg/100 µl Ansatz) wurden deshalb steigende Mengen Primer gegeben und der Einbau von dGMP in säurefällbares Material bestimmt. Die Enzymkonzentration und die Reaktionsbedingungen waren konstant. Wie aus Figur 24 hervorgeht, genügt ein molares Basenverhältnis von 1:5, um optimale Reaktionsbedingungen zu schaffen. Statistisch betrachtet heißt dies, daß nach jedem Primer, der aus 12 - 18 Nukleotiden besteht eine freie Strecke von 48 - 72 als Einzelstrangbereich vorliegende Template zur Verfügung steht, um daran einen komplementären DNA-Strang zu synthetisieren. Der interessanteste Aspekt dieses Experiments ist nicht enzymologischer, sondern wirtschaftlicher Natur. Da der hohe Preis der Homopolymerkomplexe durch den hohen Preis des Oligodeoxynukleotidanteils bedingt wird, während der Preis für die Polynukleotide im Vergleich fast vernachlässigbar gering ist, können käufliche Präparate mit

Fig. 24: Abhängigkeit der Reaktion von der Primerkonzentration bei konstanter Templatekonzentration.

Standardansätze (100 μ l) mit gleichen Mengen Partikelenzym enthielten jeweils 0.5 μ g p(C) und die angegebene Menge (dG)₁₂. Entsprechende Gemische von Template und Primer waren vorher gemischt worden und nach Erhitzen auf 80°C für 7 Minuten und anschließendem langsamen Abkühlen wurde von den verschiedenen Gemischen entsprechende Volumina in die Ansätze gegeben, um die angegebenen Konzentrationen an Template, bzw. Primer zu erreichen. Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei 37°C. Angegeben ist der Einbau von ³H-dGMP (8 Ci/mMol) pro 100 μ l und 60 Minuten.



einem Basenverhältnis 1:1 durch Zugabe von Polycytidylsäure auf ein Basenverhältnis von 1:5 gestreckt, und damit die Kosten pro Test bezüglich Template-Primer auf ein Fünftel gesenkt werden.

6. Abhängigkeit der Reaktion von der Enzymkonzentration und der Zeit

Zu Standardansätzen, die konstante Mengen Template-Primer enthielten, wurden steigende Mengen Enzym, aus einer Verdünnungsreihe gegeben und der Einbau gemessen. Figur 25 zeigt, daß der Einbau direkt proportional der Enzymkonzentration ist. Figur 26 zeigt eine Aktivitätsmessung über lange Zeit. Der Einbau erfolgt über 5 Stunden hinweg nahezu linear. Kontrollexperiment ohne Template-Primer, ohne Enzym und ohne Inkubation bei 37°C zeigen keine Aktivität.

Fig. 25: Abhängigkeit der Reaktion von Enzymkonzentration.

Aus einer Spitzenfraktion gereinigten Enzyms wurden steigende Volumina in Standardreaktionsansätze (100 μ l, 1 μ g p(C)(dG)₁₂) gegeben und nach Ausgleich der verschiedenen KCl-Konzentrationen wurde der Einbau von ³H-dGMP (8 Ci/mMol) in säureunlösliches Material, pro Stunde und Reaktionsvolumen bestimmt.

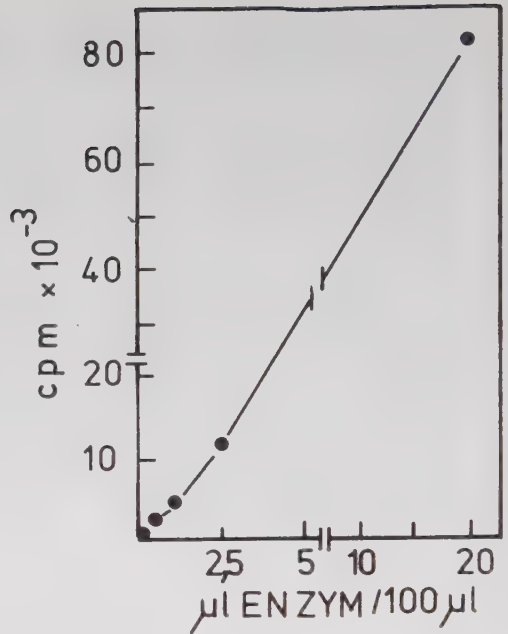
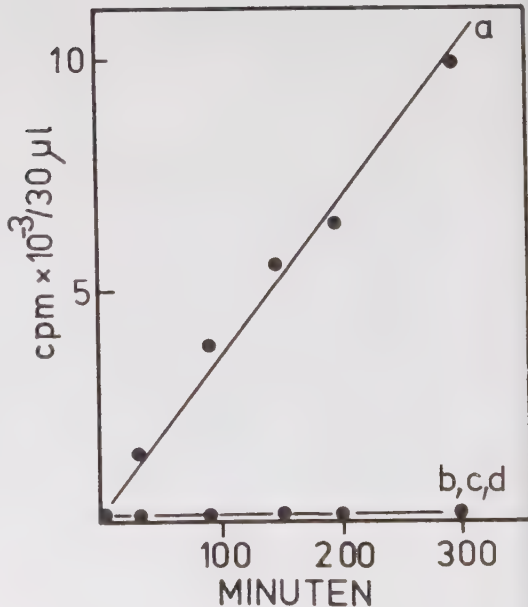


Fig. 26: Abhängigkeit der Reaktion von der Zeit.

Ein zweifacher Standardreaktionsansatz, mit p(C)(dG)₁₂ und ³H-dGTP (8 Ci/mMol) und gereinigtem Partikelenzym wurde bei 37°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeiten wurden jeweils 30 μ l entnommen und die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt (a). Zur Kontrolle wurden gleichartige Ansätze, jedoch ohne Template-Primer (b), ohne Enzym (c), und bei 0°C (d) inkubiert und die gleiche Messung durchgeführt.



7. Spezifität der Homopolymer-abhängigen Reverse Transkriptase-Reaktion

Einer Reihe von Reaktionsansätzen mit Partikelenzym wurden verschiedene Kombinationen von Template, Primer und markiertem Deoxynukleosidtriphosphat angeboten. Tabelle 10 zeigt, daß nur bei Vorliegen der theoretisch richtigen Kombination Einbau erfolgen kann. Template oder Primer allein erlauben keine Reaktion.

Tab. 10: Abhängigkeit des Partikelenzyms von der theoretisch richtigen Kombination von Template/Primer und dNTP.

	p (C)	p (A)	-	
(dG) ₁₂	10500	n.g.	0	
(dT) ₁₂	0	0	n.g.	markiertes dNTP:
-	0	n.g.	0	³ H-dGTP

	p (A)	p (C)	-	
(dT) ₁₂	5727	n.g.	0	
(dG) ₁₂	0	0	n.g.	markiertes dNTP:
-	0	n.g.	0	³ H-dTTP

Die angegebenen Kombinationen wurden in Gegenwart von Partikelenzym für 1 Stunde inkubiert (Standardbedingungen) und der Einbau bestimmt. Die Konzentration von Template bzw. Primer war jeweils 1 µg/100 µl.

8. Analyse der Reaktionsprodukte der Homopolymer-abhängigen Reverse Transkriptasereaktion durch Partikelenzym

Figur 27 A zeigt, daß die p(C) (dG)₁₂-abhängige Reverse Transkriptasereaktion durch Partikel, RNase-sensitiv ist, d.h. es handelt sich tatsächlich, wie auch schon aus dem vorhergehenden Experiment zu erwarten ist, um RNA-abhängige

Synthese. Da ein DNA-Primer verwendet wird, kann die RNase-Sensitivität der Reaktion nicht durch Zerstörung des Primers durch die Nuklease erklärt werden, sondern nur durch Einwirkung der Nuklease auf das Template. Das Reaktionsprodukt einer $p(A)(dT)_{12}$ -abhängigen Reaktion, nach Reinigung und Erhitzen (Trennen der Hybridstränge!) erweist sich als KOH- und RNase-resistent, und DNase-sensitiv, d.h. es handelt sich um DNA (Fig. 27 B). Die Verwendung verschiedener

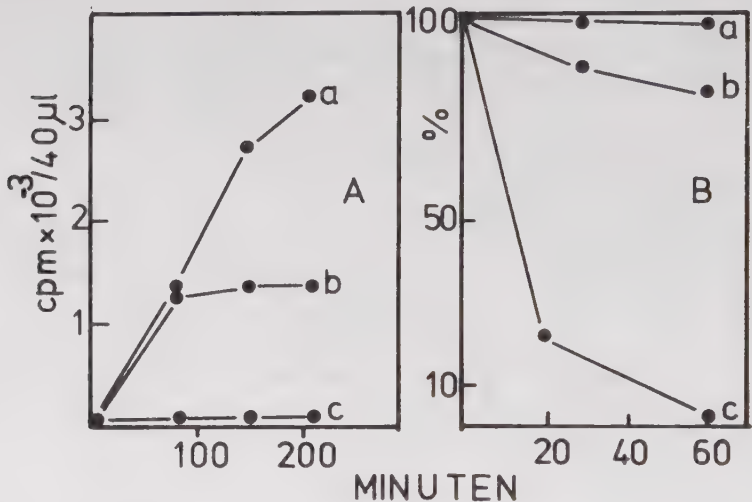


Fig. 27 A und B: Charakterisierung der Reversen Transkription synthetischer Homopolymere durch Partikelenzym.

A: Zweifachstandardreaktionsansätze mit $p(C)(dG)_{12}$ als Template-Primer-Komplex und gereinigtem Partikelenzym wurden bei $37^\circ C$ inkubiert und zu den angegebenen Zeiten $40 \mu l$ Probe entnommen und der Einbau von 3H -dGMP ($8 Ci/mMol$) in säureunlösliches Material bestimmt. Ansatz a enthielt keine Zusätze, Ansatz b wurde nach 90 Minuten auf $50 \mu g/ml$ RNase gebracht, Ansatz c enthielt $50 \mu g/ml$ RNase von Anfang an.

B: Das Reaktionsprodukt einer $p(A)(dT)_{12}$ -abhängigen Reverse Transkriptasereaktion wurde durch SDS-Phenolbehandlung und Alkoholfällung gereinigt. Konstante Mengen dieses Materials (ca. 2000 cpm) wurden a) in Gegenwart von $0.3 M$ KOH bei $45^\circ C$, b) in Gegenwart von $50 \mu l/ml$ RNase bei $37^\circ C$ und c) in Gegenwart von $100 \mu g/ml$ DNase, $10 mM$ Mg^{++} bei $37^\circ C$ inkubiert. Das für Test b und c eingesetzte Material wurde vor Testbeginn auf $80^\circ C$ erhitzt und schnell abgekühlt. Angegeben ist die Säureunlöslichkeit in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Komplexe für die beiden Teile des Experiments erfolgte nicht ohne Grund: Mit $p(A)(dT)_{12}$ läßt sich keine RNase-Sensitivität darstellen, da $p(A)$ resistent gegen RNase I ist. Die RNA-Abhängigkeit der DNA-Synthese mit diesem Template-Primer müßte also mit anderen Methoden dargestellt werden.

(Z.B. Dichtegradientenzentrifugation.) Das primäre Reaktionsprodukt der $p(C)(dG)_{12}$ -abhängigen DNA-Synthese läßt sich durch kurzzeitiges Erhitzen nur in geringem Maße DNase-sensitiv machen, da das Hybridmolekül besser zusammengehalten wird (3 Wasserstoffbrückenbindungen pro Basenpaarung, bei der A = T-Bindung sind es nur 2). Es bestehen jedoch keine Zweifel an der DNA-Natur des synthetisierten Komplementärstranges: Es wurden DNA-Vorstufen eingebaut, und das Produkt ist KOH-stabil.

9. Kontrolle auf Anwesenheit von Nukleasen in den Enzympräparationen

Figur 27 A hatte gezeigt, daß die Anwesenheit von RNase I den Reverse Transkriptasetest mit dem Template $p(C)(dG)_{12}$ empfindlich stört. Um nun herauszufinden, wieviel RNase gerade noch stört, wurde ein Rekonstitutionsexperiment durchgeführt: Standardreaktionsansätze mit $p(C)(dG)_{12}$ und jeweils gleicher Konzentration an Reverser Transkriptase (hier wurde AMV-Reverse Transkriptase verwendet) wurden mit steigenden Konzentrationen an RNase I versetzt und der Einbau von dGMP in säurefällbares Material bestimmt. Der Ansatz ohne Nuklease zeigte eine lineare Kinetik, während bereits 0.5 pg RNase zu einem erkennbaren Umknicken der Kinetik führten. Daraus kann geschlossen werden, daß bei streng linear verlaufender $p(C)$ -abhängigen Reaktion weniger als 0.5 pg RNase pro 100 μ l enthalten sind. D.h., der Reverse Transkriptasetest mit dem Template $p(C)(dG)_{12}$ stellt in sich bereits eine sehr sensitive RNase-Kontrolle dar. Die meisten Präparationen von Partikelenzym zeigten eine lineare Kinetik in diesem Test, waren also praktisch frei von störender RNase.

Zur DNase-Kontrolle wurde gereinigtes Partikelenzym mit markierter DNA aus *E. coli*, in der Gegenwart von Mg^{++} inkubiert. Nach einer Stunde zeigte sich keine meßbare Abnahme der säurefällbaren Radioaktivität, d.h. das Enzym war frei von störender DNA-Exonuklease.

III. Identifikation des gereinigten Enzyms als Reverse Transkriptase

1. Untersuchung der Spezifität für bestimmte Homopolymere

Wie in der Einleitung (Tab. I) gezeigt, kann im Hühnersystem eine Polymerase durch ihre verschiedene Spezifität für die Template-Primer-Komplexe $p(C)(dG)_{12}$, $p(dC)(dG)_{12}$, $p(A)(dT)_{12}$, $p(dA)(dT)_{12}$ sowie für $(dG)_{12}$ klassifiziert werden. Von dieser Möglichkeit wurde zur Identifikation des Enzyms zunächst Gebrauch gemacht. Fig. 28 A und B zeigen die kinetische Messung der Polymerase-Aktivität mit diesem Satz synthetischer Homopolymere in Abhängigkeit von Partikelenzym (28 A) und vergleichsweise in Abhängigkeit von Reverser Transkriptase aus AMV (28 B). Offensichtlich zeigen beide Enzyme gleiche Template-Spezifität. Die Werte für den Einbau im streng linearen Bereich sind in der Tab. 11 vergleichend gegenübergestellt. Das Partikelenzym besitzt wie das AMV-Enzym eine RNA $p(C)-p(A)-$ und eine DNA $(p(dC), p(dA))$ -abhängige Aktivität. Es zeigt sich (Tab. 12), daß die Verwendung der beiden Modell-RNA-Matrizen $p(A)$ und $p(C)$, und der DNA-Matrize $p(dC)$ durch beide Enzyme etwa im gleichen Verhältnis erfolgt. Ein Unterschied zeigt sich nur in dem Verhältnis der Verwendung von $p(A) : p(dA)$. Ob dies - was wahrscheinlich ist - eine Eigenart des Partikelenzym oder eine noch nicht abgetrennte Verunreinigung darstellt, bleibt noch zu untersuchen.

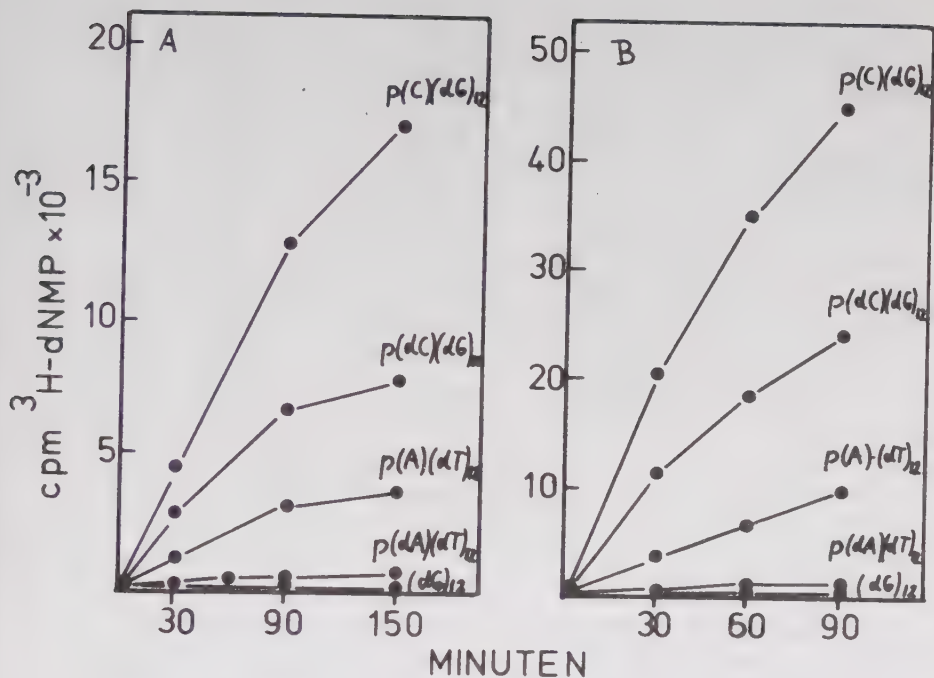


Fig. 28: Polymeraseaktivität von Partikelenzym (A) und AMV-Enzym (B), in Abhängigkeit verschiedener Template-Primer-Komplexe.

Zweifachreaktionsansätze (Standardbedingungen) enthielten gleiche Mengen Partikelenzym (Experiment A) oder AMV-Enzym (Experiment B). Die Ansätze enthielten jeweils 2 µg der angegebenen Template-Primer-Komplexe, bzw. Primer allein, und jeweils 10 µCi des geeigneten ^3H -dNTP (8 Ci/µMol). Die Ansätze mit $(dG)_{12}$ enthielten ^3H -dGTP. Zu den angegebenen Zeiten wurden Aliquots entnommen und die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt. Die Aliquots hatten ein Volumen von 45 µl in Exp. A und 30 µl in Experiment B.

Tab. 11: Einbau von ^3H -dNMP in TCA-fällbares Material in Abhängigkeit von verschiedenen Template-Primer-Komplexen.

Enzym aus	Template/ Primer	cpm/60 Min x 100 μl	pMol/60 Min x 100 μl
Partikeln	p(C) (dG) ₁₂	18 628	3.74
	p(dC) (dG) ₁₂	8 128	1.63
	(dG) ₁₂	0	0.00
	p(A) (dT) ₁₂	4 355	0.87
	p(dA) (dT) ₁₂	351	0.07
AMV	p(C) (dG) ₁₂	82 628	16.56
	p(dC) (dG) ₁₂	43 689	8.78
	(dG) ₁₂	0	0.00
	p(A) (dT) ₁₂	20 613	4.14
	p(dA) (dT) ₁₂	423	0.08

Standardreaktionsansätze wurden in Anwesenheit von 1 μg des angegebenen Komplexes bei 37°C inkubiert und der Einbau kinetisch verfolgt. Die Werte wurden aus dem streng linearen Teil der Kinetiken entnommen.

Tab. 12: Verhältnis der Aktivitäten mit verschiedenen Templates für Partikel- und AMV-Enzym.

Templates	Verhältnis der erhaltenen Aktivitäten für	
	Partikel-Enzym	AMV-Enzym
$\frac{\text{p(C) (dG)}_{12}}{\text{p(dC) (dG)}_{12}}$	2.29	1.88
$\frac{\text{p(A) (dT)}_{12}}{\text{p(dA) (dT)}_{12}}$	12.4	48.6
$\frac{\text{p(C) (dG)}_{12}}{\text{p(A) (dT)}_{12}}$	4.27	3.99

Die Werte wurden unter Verwendung von Tabelle 11 berechnet.

2. Heteropolymere Reverse Transkription durch das Partikelenzym

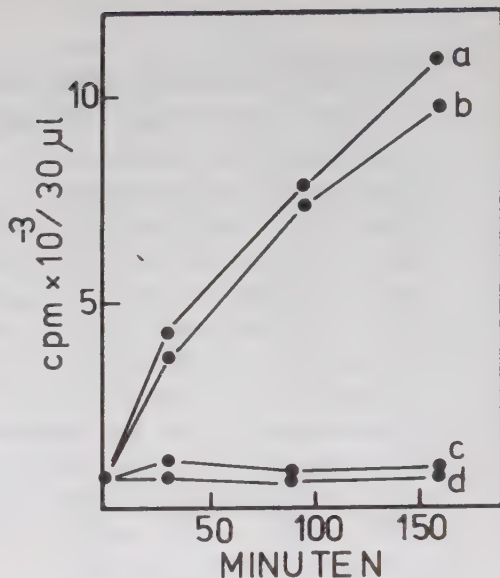
a) Reaktionsbedingungen und Reaktionsverlauf

In den folgenden Experimenten wird die Reverse Transkription natürlicher, heteropolymerer RNA am Beispiel von Kaninchen Globin mRNA untersucht. Wie die kinetische Messung in Fig. 29 zeigt, erkennt das gereinigte Enzym ebenso wie das partikelgebundene Enzym (s. S. 44) Globin mRNA als Template. Die Reaktion wird durch RNase oder Weglassen der Globin mRNA vollständig gehemmt. Actinomycin D zeigt keinen deutlichen Effekt auf die Reaktion. Die Tab. 13 zeigt einen Vergleich mit AMV-Enzym, sowie weitere Kontrollen. Bezogen auf den Einbau mit p(C) als Template ist die relative Template-Effizienz der Globin mRNA für beide Enzyme gleich groß. Der Einbau ist abhängig von Primer (dT)₁₂ und von allen vier Triphosphaten als Substrat. Bei Verwendung von p(A) statt p(C) als Template findet kein Einbau statt. Dies beweist, daß das verwendete ³H-dGTP kein ³H-TTP als Verunreinigung enthält, was am 3' Poly A Ende der mRNA eine Transkription des heteropolymeren Messenger-Anteils vortäuschen könnte. Der Umstand, daß Actinomycin D praktisch nicht hemmt, zeigt, daß unter den gewählten Bedingungen nur RNA-abhängige DNA-Synthese abläuft, und die gebildete DNA-Kopie nicht als Template für eine anschließende (Actinomycin D-sensitive) DNA-abhängige DNA-Polymerasereaktion dient.

Um den relativen Einbau der vier verschiedenen Deoxynukleotidtriphosphate in die Komplementär-DNA zu messen, wurden vier identische Reaktionsansätze mit jeweils einem radioaktiv markierten (³H) Deoxynukleosidtriphosphat und den restlichen drei in unmarkierter Form für 60 Minuten inkubiert. Die spezifische Radioaktivität aller vier Deoxynukleotidtriphosphate war gleich (8 Ci/mMol).

Fig. 29: Reverse Transkription von Globin-mRNA durch Partikel-enzym.

Zweifachstandardreaktionsansätze mit gereinigtem Partikel-enzym enthielten pro 100 μ l : 2.5 μ g Globin mRNA, 1 μ g (dT)₁₂, 10 μ Ci ³H-dGTP (8 Ci/mMol). Die Konzentration an dATP, dCTP und dTTP betrug je 0.6 mM. Ansatz a enthielt keine weiteren Zusätze, b enthielt 50 μ g/ml Actinomycin D, c enthielt 50 μ g/ml RNase und Ansatz d enthielt keine mRNA. Zu den angegebenen Zeiten wurden aus den bei 37°C inkubierten Ab-sätzen 30 μ l entnommen und der Einbau von ³H-dGMP in säureun-lösliches Material bestimmt.



Tab. 13: Reverse Transkription von Globin mRNA.

Template	Primer	Reaktions- bedingungen	cpm ³ H-dGMP eingebaut durch	
			Partikel E.	AMV E.
mRNA	(dT) ₁₂	komplett	3299	3800
mRNA	(dT) ₁₂	kompl. + Act. D	2866	
mRNA	(dT) ₁₂	kompl. + RNase	0	
mRNA	-	komplett	866	
mRNA	(dT) ₁₂	- dCTP	880	
mRNA	(dT) ₁₂	- dATP	0	
-	(dT) ₁₂	komplett	0	
p(C)	(dT) ₁₂	komplett	100883	96200
p(A)	(dT) ₁₂	komplett	0	

Die Inkubationszeit für die Ansätze betrug 160 für Partikel-Enzym, und 40 Minuten für AMV-Enzym. Ein Blindwert von 200 cpm ist abgezogen. Bedingungen wie in Fig. 18.

Tab. 14: Einbau verschiedener ^3H -dNMP in DNA komplementär zu Globin Messenger (= Globin-c-DNA).

^3H -dNTP	Einbau	
	cpm/100 μl x 60 Min	pMol/mol x 60 Min
dGTP	1 817	3.6
dCTP	620	1.2
dATP	1 092	2.1
dTTP	4 455	8.9

Die Standardansätze enthielten 2.5 μg Globin mRNA, 2 μg (dT)₁₂, die unmarkierten dNTP in einer Konzentration von 0.6 mM und gleiche Mengen Partikelenzym. Pro markiertes dNTP waren 5 $\mu\text{Ci}/100 \mu\text{l}$ eingesetzt.

Ermittelt man aus den Einbauwerten in Tab. 9 den relativen Einbau für die einzelnen Basen und stellt diese Zahlen dem Basenverhältnis in der Globin mRNA gegenüber, so ergibt sich das folgende Bild:

Einbau-Rate: dGTP:dCTP:dATP:dTTP = 1 : 0.34 : 0.60 : 2.45

Basenverhältnis im Messenger: C : G : U : A = 1 : 0.29 : 0.588 : 0.794

Man erkennt, daß beim Einbau der Deoxynukleotidtriphosphate das gleiche Verhältnis auftritt, welches für den komplementären Basensatz in der RNA gilt. Lediglich der Einbau des dTTP weicht stark davon ab. Dies ist damit zu erklären, daß das homopolymere 3'-Poly A Ende des Messengers in Gegenwart des Primers (dT)₁₂ mit höherer Effizienz transkribiert wird als der heteropolymere Anteil des Messengers. Damit ist direkt gezeigt, daß die Verwendung von dTTP zur Messung der heteropolymeren Transkription in diesem System ungeeignet ist. Das Einbauverhältnis der anderen 3 Triphosphate dGTP, dCTP und dATP beweist gleichzeitig, daß der heteropolymere Anteil der mRNA korrekt abgelesen wird. Um in Ergänzung zu den erhaltenen

Daten die Charakterisierung des Materials als Globin c-DNA zweifelsfrei durchzuführen, wurde in größeren Ansätzen (4-5-facher Normalansatz) Material mit ^3H oder ^{32}P -dNTP markiert und auf Nuklease-Sensitivität, Alkaliresistenz, Sedimentationskonstante sowie insbesondere auf seine Fähigkeit zur Rückhybridisierung mit der Template RNA untersucht.

b) Untersuchung der chemischen Natur des synthetisierten Materials

Das radioaktiv markierte Reaktionsprodukt einer durch Partikelenzym katalysierten reversen Transkription von Globin mRNA wurde durch Phenolisation und Alkoholfällung gereinigt und dann verschiedenen Kontrollen unterzogen (Tabelle 15). Das synthetisierte Material ist KOH-resistent. Nach Entfernen der Template-RNA aus der Probe (durch Alkalibehandlung) erweist sich das Produkt als weitgehend RNase-stabil und DNase-sensitiv. Damit ist gezeigt, daß tatsächlich DNA synthetisiert wurde.

Tab. 15: Produktanalyse der durch Partikelenzym synthetisierten Globin-c-DNA.

Bedingungen	cpm säureunlösliches Material
unbehandelt	2 600
KOH, 0.2 M, 45°C, 30 Minuten	2 800
KOH, 0.25 M, Raumtemperatur, 20 Stunden, Neutralisation, / + RNase, 50 µg/ml, 37°C, 30 Minuten	2 070
KOH, 0.25 M, Raumtemperatur, 20 Stunden, Neutralisation, + DNase, 50 µg/ml, 37°C, 30 Minuten, + 10 mM Mg ⁺⁺	780

Durch SDS-Phenolbehandlung und Alkoholfällung gereinigte ^{32}P -DNA, die durch Reverse Transkription von Globin-mRNA durch Partikelenzym synthetisiert worden war, wurde unter den angegebenen Bedingungen inkubiert und die Säureunlöslichkeit bestimmt.

c) Bestimmung der Größe des isolierten DNA-Produktes

Nach Ablösung des Produkts von der Template durch Alkalihydrolyse letzterer (siehe auch Fig. 20,21) läßt sich seine Sedimentationskonstante durch Band-Sedimentation zu ca. 5 S bestimmen (Fig. 30). Dieser Wert ist zwar deutlich kleiner als die Sedimentationskonstante von Globin mRNA (9 S), liegt aber in dem Bereich, der für Produkte Reverser Transkription unter üblichen Bedingungen zu erwarten ist.

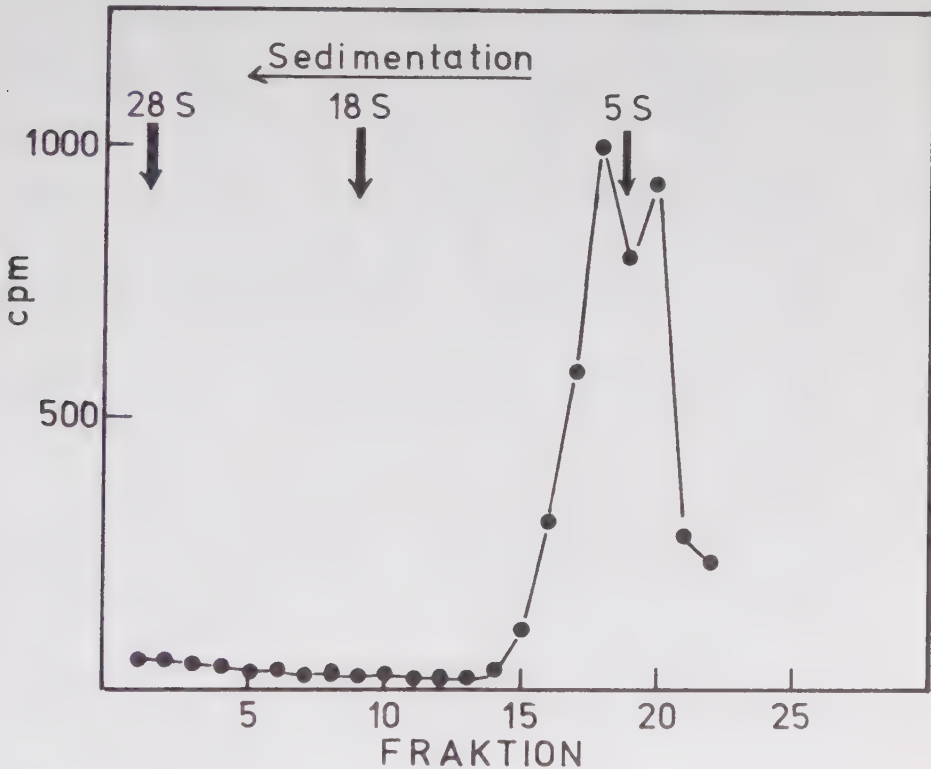


Fig. 30: Sedimentationsanalyse der gereinigten, von Partikelenzym synthetisierten Globin-c-DNA.

Das alkalibehandelte und neutralisierte DNA-Produkt (Fig. 32) wurde in einem 5-20%igen Rohrzuckergradienten (STE, 0.1% SDS) im Rotor SW 56 Ti für 4 Stunden bei 45 000 Upm zentrifugiert. Als Sedimentationsmarker wurde ribosomale RNA aus Hühnermyeloblasten (28 S, 18 S, 5 S) im gleichen Gradienten mitenzentrifugiert. Nach dem Abnehmen des Gradienten wurde die Position des Markers durch optische Dichtemessung, die der DNA durch Bestimmung der TCA-fällbaren Radioaktivität vorgenommen.

d) Überprüfung der Spezifität der reversen Transkription von Globin mRNA durch Partikelenzym

Der erhaltene Wert von 5 S zeigt, daß das Produkt groß genug ist, um mit Nukleinsäuren komplementärer Basensequenz hybridisiert werden zu können. Damit ist die Voraussetzung gegeben, um durch Rückhybridisierung des Produkts an Globin mRNA die korrekte Basenablesung und damit die Synthese von cDNA durch Reverse Transkription nachzuweisen. Zum Nachweis der Hybridisierung eignet sich die Gleichgewichtssedimentation im Caesiumsulfat-Gradienten, in dem sich RNA, RNA/DNA-Hybride und DNA durch unterschiedliche Schwimmdichten kennzeichnen. Der Ablauf des Experiments ist in Fig. 31 - 33 wiedergegeben. Partikelenzym, Globin mRNA und (dT)₁₂ wurden in der Gegenwart von unmarkiertem dTTP (0.5 mM) und ³H-dATP, ³H-dCTP, ³H-dGTP (je 8 Ci/mMol, 15 µCi/100 µl Reaktionsansatz) für 2 Stunden inkubiert, anschließend wurde das Reaktionsprodukt durch zweimalige SDS-Phenolbehandlung und Alkoholfällung gereinigt. Im Dichtegradienten befand sich das markierte Material im Dichtebereich für RNA·DNA Hybridmoleküle Fraktion 15, (Fig. 31), was zeigt, daß das Produkt insgesamt RNA-gebunden ist. Wurde das gereinigte Produkt für 20 Stunden bei Raumtemperatur in Gegenwart von 0.25 M KOH inkubiert und nach anschließender Neutralisation seine Schwimmdichte im Cs₂SO₄-Dichtegradienten bestimmt, so ergab sich die in Fig. 32 gezeigte Verschiebung des markierten Materials in den DNA-Dichtebereich. Wurde derartige Material mit Globin mRNA (5 µg/100 µl Ansatz) in Gegenwart von 50% Formamid, 0.4 M NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM Tris, pH 7.4 für 20 Stunden bei 37°C inkubiert, so erschien nach Dichtegradientenanalyse der Hauptteil der Radioaktivität im Bereich zwischen RNA- und RNA·DNA Hybriddichte (Fig. 33). Dies ist zu erwarten, wenn relativ kleine DNA-Moleküle (5 S Produkt) an einen Überschuß relativ großer RNA-Moleküle (9 S mRNA) durch spezifische Hybridisierung gebunden werden. Der gleiche Satz von Experimenten wurde mit Produkt durchgeführt, das nicht durch freies Enzym, sondern durch partikelgebundenes Enzym (hochgereinigte Partikel) synthetisiert worden war. Es ergab sich das gleiche Bild.

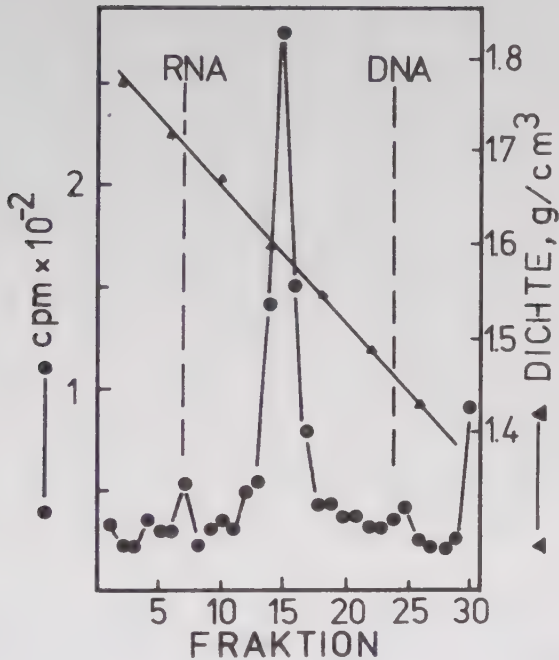


Fig. 31: Dichtegradientenanalyse des Reaktionsproduktes der Globin mRNA-abhängigen DNA Polymerasereaktion durch Partikelenzym.

Ein Vierfachreaktionsansatz, entsprechend den in Figur 18 aufgeführten Bedingungen, wurde in Gegenwart von Actinomycin D (50 µg/ml) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Das Produkt wurde durch SDS- und Phenolbehandlung und anschließende Alkoholfällung gereinigt. Die gefällte Nukleinsäure (+ zugesetzte t-RNA als Carrier) wurde abzentrifugiert und in SSC Puffer aufgenommen. Ein Aliquot des Materials nach dieser Behandlung wurde mit 8 ml Cs₂SO₄ der Dichte 1.55 g/ml (in STE Puffer) gemischt und im Rotor Ti 50 bei 43 000 Upm, 15°C, für 60 Stunden zentrifugiert. Abnahme in ca. 30 Fraktionen erfolgte durch Anstechen des Röhrchens von unten. Die Bestimmung der Dichte erfolgte durch Refraktionsmessung, die Bestimmung der Position des markierten Materials durch Messung der TCA-fällbaren Radioaktivität.

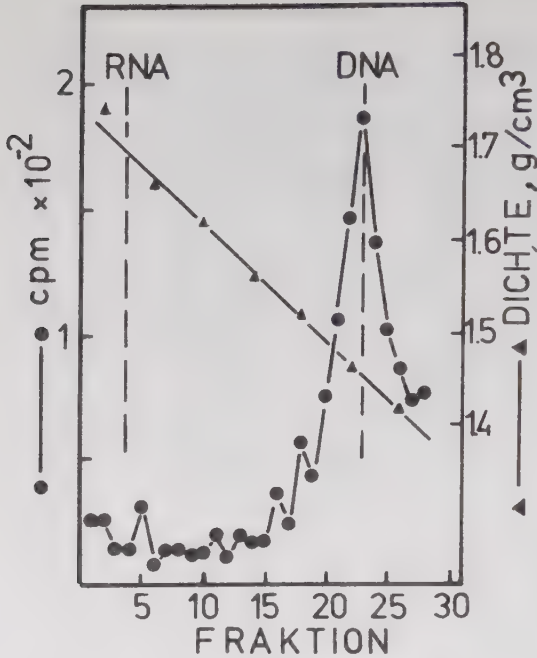


Fig. 32: Dichte der Globin-c-DNA.

Gereinigtes Reaktionsprodukt (Fig. 20) wurde auf 0.25 M KOH gebracht und bei Raumtemperatur für 18 Stunden inkubiert. Anschließend wurde es durch Zugabe von HCl neutralisiert und der in Fig. 31 beschriebenen Dichtegradientenanalyse unterworfen. Der Gradient wurde von unten abgenommen und die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt.

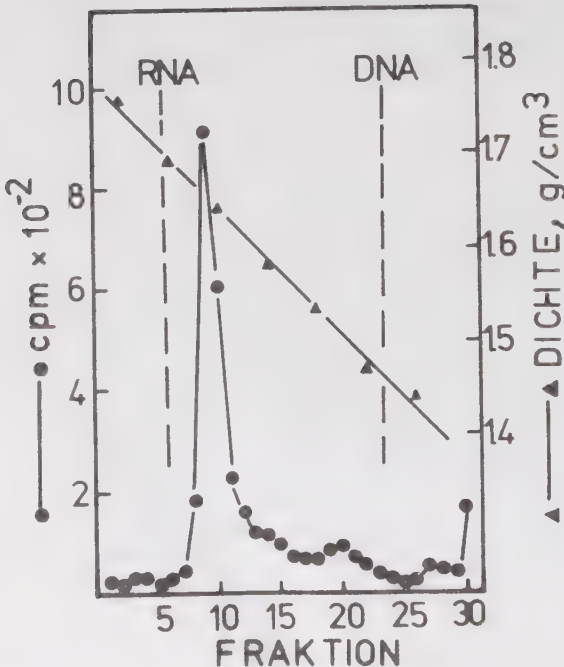


Fig. 33: Rückhybridisierung der Globin-c-DNA an Globin-mRNA.

Ca. 3000 cpm Globin-c-DNA, die wie in Fig. 20 und 21 beschrieben, gereinigt und alkaliverdaut war, wurde neutralisiert und in einem Reaktionsvolumen von 100 μl mit 5 μg Globin-mRNA zusammengebracht. Der Ansatz enthielt 0.4 M NaCl, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 und 50% Formamid. Das Gemisch wurde bei 37°C für 20 Stunden inkubiert und anschließend der Dichtegradientenanalyse unterzogen.

Die bis hierher geschilderten Experimente über Reaktionsbedingungen, Reaktionsverlauf und Produktanalyse der reversen Transkription von Globin mRNA durch Partikelenzym genügen den in der Literatur erhobenen Anforderungen zur Charakterisierung einer Reversen Transkriptase (98). Bei strenger Betrachtung der Beweisführung lassen sich folgende Behauptungen aus den Experimenten ableiten: Partikelgebundenes und freies Enzym aus Partikeln sind in der Lage, in Abhängigkeit von Globin mRNA und Primer, heteropolymere DNA zu synthetisieren. Das unbehandelte Primärprodukt bandiert in der für RNA-DNA-Hybride charakteristischen Dichte, die von der Template abgelöste DNA kann rückhybridisiert werden. Damit ist sehr wahrscheinlich gemacht, daß ein basenkomplementäres DNA-Transkript der Globin mRNA synthetisiert wurde, zwingend bewiesen ist es jedoch nicht. Das Auftreten der markierten DNA in der Hybriddichteregion und in der Region zwischen RNA und Hybriddichte (nach der Rückhybridisierung) muß nicht notwendigerweise bedeuten, daß RNA und DNA als echtes Hybrid, in ihrer ganzen Länge basengepaart, vorliegen. Ein "Pseudo-hybrid" aus RNA und DNA, die für den größeren Teil ihrer Sequenz voneinander verschieden sind und nur über einen kleinen (vielleicht sogar unspezifischen p(A)-p(dT)-Bereich) zusammengehalten werden, würde im gleichen Dichtebereich zu finden sein. Um nun herauszufinden, ob das Enzym tatsächlich ein echtes Hybrid synthetisiert und ob die Rückhybridisation spezifisch ist, wurde die Analyse verfeinert.

Es wurde die Nuklease S1 aus *Aspergillus oryzae* hinzugezogen. Dieses Enzym verdaut sowohl RNA- als auch DNA-Einzelstränge, und zeigt keine Aktivität mit Doppelsträngen (DNA-DNA, RNA-RNA, RNA-DNA). Durch eine Kombination von S1-Behandlung und Dichtegradientenanalyse sollte es möglich sein, zwischen echten Hybridmolekülen und den theoretisch möglichen "Pseudohybriden" zu unterscheiden. Weiterhin sollten mit Hilfe des Enzyms Schmelzkurven der Hybride zu messen sein, die weitere Aussagen über Genauigkeit der reversen Transkription liefern könnten.

Da sich gezeigt hatte, daß zwischen freiem Partikelenzym und einer hochgereinigten Partikelfraktion kein Unterschied bezüglich der Verwendung von Globin mRNA besteht, die Partikel jedoch wesentlich leichter in konzentrierter Form zu gewinnen sind als Enzym, wurden die folgenden Experimente mit Reaktionsprodukt eines Ansatzes mit gereinigten Partikeln durchgeführt.

Das aus dem Ansatz gereinigte Produkt wurde auf zwei Aliquots verteilt. Das erste sollte zur Charakterisierung des Primärproduktes dienen, aus dem zweiten sollte die freie DNA isoliert und das mit Globin mRNA gebildete Rückhybrid analysiert werden. Es folgt zuerst die Charakterisierung des Primärproduktes:

Eine Probe des markierten Primärproduktes wurde in einen Ansatz zum Test auf Resistenz gegen S1-Nuklease eingesetzt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der TCA-fällbaren radioaktiven Zerfälle im Vergleich zur unbehandelten Probe ermittelt. Als weiterer Vergleich wurde das Reaktionsprodukt einer Globin mRNA-abhängigen DNA-Synthese durch AMV Reverse Transkriptase (als "authentischer" Reverser Transkriptase) den gleichen Bedingungen unterworfen. Beide Produkte zeigen eine S1-Resistenz von ca. 62% (Tabelle 16).

Als nächstes wurde die Schwimmdichte von unbehandeltem Primärprodukt mit der Dichte von S1-behandeltem Primärprodukt verglichen. Wie Figur 34 und 35 zeigen, bandieren beide in dem für Hybridmoleküle typischen Bereich. Die teilweise S1-Sensitivität läßt sich somit nur dadurch erklären, daß an einigen Stellen DNA-Stücke überstehen, während an anderer Stelle freie RNA vorliegt. (Die vollständige Rückhybridisierbarkeit der isolierten DNA, siehe Tab. 17, beweist jedoch, daß die S1-sensitiven Bereiche ebenfalls exakte Transkripte der RNA darstellen.)

Tab. 16: Resistenz des gereinigten Reaktionsproduktes Globin mRNA-abhängiger DNA-Synthese gegen die einzelstrangspezifische Nuklease S1.

Synthese des Produktes durch	Partikelenzym	AMV-Enzym
Produkt ohne S1-Behandlung (säureunlösliche cpm)	9680	38 400
Produkt nach S1-Behandlung (säureunlösliche cpm)	6000	24 000
%-S1-Resistenz	62	62.5

In einem Reaktionsansatz von 0.5 ml befanden sich gereinigte Partikel mit einer Synthesekapazität von 290 pMol dGMP-Einbau/60 Minuten (bezogen auf p(C)(dG)₁₂. Der Ansatz enthielt 12.5 µg Globin mRNA, 5 µg (αr)₁₂ und ³H-dATP (11 Ci/mMol), ³H-dCTP (17 Ci/mMol), ³H-dGTP (13 Ci/mMol) in den Endkonzentrationen von 46 µM, 30 µM, 38 µM. Das Deoxynukleosid-triphosphat dTTP lag unmarkiert vor (0.3 mM). Neben den für den Reaktionsansatz notwendigen Salzen und Puffer (Standardbedingungen) enthielt der Ansatz 0.1% NP 40 und 50 µg/ml Actinomycin D. Nach 180 Minuten Inkubation bei 37°C wurde das Produkt durch SDS-Phenolbehandlung, Hexadecyltrimethylammoniumbromidfällung und Alkoholfällung gereinigt. Nach der Alkoholfällung wurde das Produkt in 270 µl SSC aufgenommen. Das Reaktionsprodukt einer durch AMV-gesteuerten Reversen Transkription von Globin mRNA wurde auf analoge Weise isoliert. Jeweils 20 µl des Produktes (in SSC) wurden mit 50 µl SSC verdünnt und auf zwei Röhrchen verteilt. Zu allen Röhrchen wurde 500 µl S1-Testansatz (siehe Methoden) zugegeben, jedoch in einem Fall ohne im anderen Fall mit Enzym (0.2 Einheiten). Nach 60 Minuten Inkubation bei 37°C wurden die Proben gefällt (10% TCA, 100 µg BSA) und die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt.

Das Kontrollexperiment mit AMV-Enzym beweist, daß die teilweise S1-Sensitivität des primären Reaktionsproduktes einer reversen Transkription keine Besonderheit des Partikelenzym darstellt, sondern auch bei authentischer Reverser Transkriptase gefunden wird.

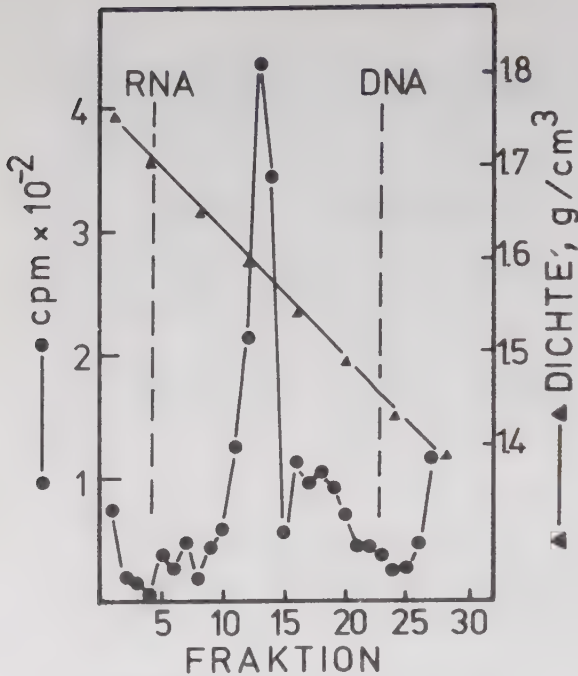


Fig. 34: Dichte des un-
behandelten Reaktions-
produktes einer rever-
sen Transkription von
Globin mRNA durch Par-
tikel.

Gereinigtes Reaktions-
produkt des in Tab. 16
beschriebenen Ansatzes
wurde ohne weitere Be-
handlung der Dichte-
gradientenzentrifugation
(s. Fig. 31) unterzogen.
Nach dem Lauf wurde von
unten fraktioniert und
die säureunlösliche
Radioaktivität bestimmt.

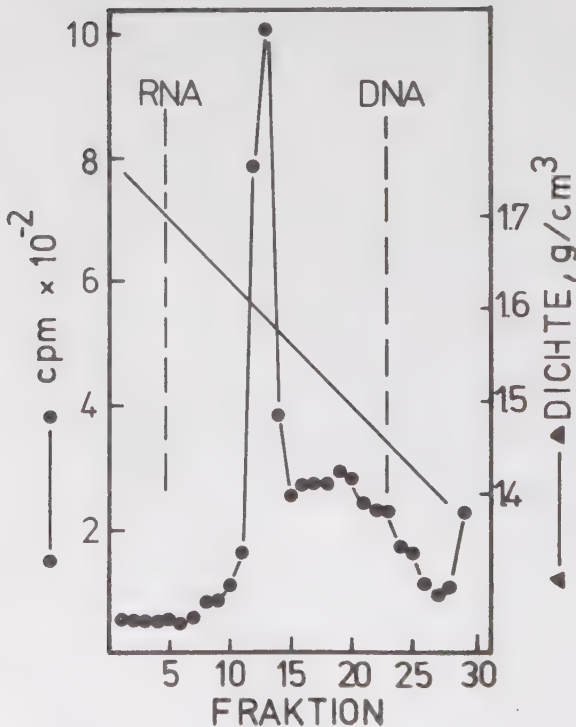


Fig. 35: Dichte des S1-
behandelten Primärpro-
duktes.

Das in Fig. 34 beschrie-
bene Reaktionsprodukt
wurde mit 0.2 Einheiten
S1-Nuklease für 60 Minu-
ten inkubiert. Nach Ab-
trennen der Nuklease
durch Phenolisieren wur-
de die Dichtegradienten-
zentrifugation, wie vor-
her beschrieben, durch-
geführt.

Nun wurde das zweite Aliquot des gereinigten Primärproduktes (ca. 120 000 cpm) auf 0.3 M KOH gebracht und 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen lassen. Der radioaktiv markierte DNA-Anteil erwies sich als KOH-resistent (96.5%), und nach dem Alkaliverdau als S1-sensitiv (97.7%). Durch den Alkaliverdau wurde also die unmarkierte Template entfernt und die markierte Produkt-DNA lag nun in einzelsträngiger Form vor. Nach Rückhybridisierung gegen Globin mRNA erwies sich die markierte DNA wieder als S1-resistent (96%), während DNA, die mit Polyadenylsäure unter Hybridisationsbedingungen inkubiert wurde, zum größten Teil S1-sensitiv blieb. Daraus folgt, daß die von Partikelenzym synthetisierte DNA tatsächlich komplementär zu Globin mRNA ist. Die Daten sind in Tabelle 17 zusammengestellt.

Wurde das Rückhybrid direkt auf Cs_2SO_4 -Dichtegradienten untersucht (Fig. 36), so zeigte sich, ebenso wie in den Vorexperimenten (Fig. 33), daß es in einem Dichtebereich zwischen Hybridmolekülen und RNA bandierte.

Wurde das Rückhybrid vor der Dichtegradientenanalyse mit S1-Nuklease behandelt (was zu keinem Verlust markierter DNA führt, wie Tab. 17 zeigt), so trat es jetzt in der für 1:1 Hybridmoleküle charakteristischen Dichte auf. Dies steht in guter Übereinstimmung mit der Annahme, daß das Rückhybrid aus einem größeren DNA-Anteil (9 S) und einem kleineren DNA-Anteil (5 S, siehe auch Fig. 30) besteht, wobei DNA und RNA in Basenpaarung vorliegen. Beim S1-Einwirken wird das Überstehende einzelsträngige RNA-Stück verdaut und es bleibt ein echtes basengepaartes Hybrid übrig.

Der Vergleich der Schmelzkurve des Rückhybrids mit den Schmelzkurven für p(A)p(dT) und "authentischem", d.h. durch AMV-Reverse Transkriptase synthetisierter Hybrid aus Globin mRNA x cDNA zeigt, daß das Rückhybrid einen für heteropolymere Hybridmoleküle mit exakter Basenpaarung kennzeichnenden Schmelzpunkt (T_m) von 85°C aufweist (Fig. 38).

Tab. 17: Analyse des von der Template befreiten DNA-Produktes, vor und nach Rückhybridisierung.

	S1-Resistenz	KOH-Resistenz
Produkt nach Alkaliverdau	2.3%	96.5%
DNA nach Hybridisierung gegen		
a) Polyadenylsäure	8%	n.g.
b) Globin mRNA	96%	n.g.

Reaktionsprodukt einer Globin mRNA-abhängigen DNA-Synthese (Tab. 16) durch Partikelenzym wurde auf 0.3 M KOH gebracht und bei Raumtemperatur für 24 Stunden inkubiert. Nach dem Neutralisieren wurde jeweils ein Aliquot von 5 µl mit bzw. ohne S1-Enzym unter geeigneten Bedingungen inkubiert und jeweils die säureunlösliche Radioaktivität gemessen. Die KOH-Resistenz wurde durch einen Vergleich der säureunlöslichen Radioaktivität vor bzw. nach dem Alkaliverdau bestimmt. 10 µl der alkalibehandelten und neutralisierten DNA wurden mit 5 µg Polyadenylsäure in einem Reaktionsvolumen von 100 µl, in der Gegenwart von 0.4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 2 mM EDTA und 50% Formamid (v/v) für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz geteilt, und eine Hälfte mit S1-Nuklease, die andere Hälfte ohne Nuklease inkubiert. Das Volumen dieses Ansatzes betrug 500 µl, so daß die Konzentration an Formamid die S1-Nuklease nicht mehr stören konnte. 120 µl des alkalibehandelten und neutralisierten Produktes wurden mit 15 µg Globin mRNA, ebenfalls unter Hybridisationsbedingungen, in einem Ansatz von 360 µl für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Rückhybrid durch Zugabe von 500 µg t-RNA, 3.5 ml abs. Äthanol und 0.3 ml 5 M NaCl gefällt (-20°C, über Nacht). Das Rückhybrid wurde durch Zentrifugation in der Sorvall-Zentrifuge gesammelt und in SSC aufgenommen. Ein Aliquot davon wurde mit S1-Enzym, ein zweites ohne S1-Enzym, unter geeigneten Bedingungen inkubiert und die Resistenz gegen die Nuklease bestimmt. Der Rest des Rückhybrides wurde für die in Figur 36,37,38 zu beschreibenden Experimente verwendet.

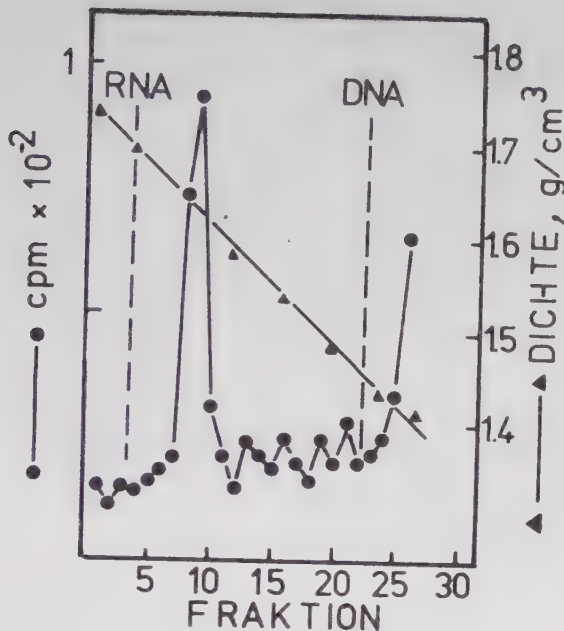


Fig. 36: Dichte des un-behandelten Rückhybrids. Rückhybrid (s. Tab. 17) wurde direkt der Cs_2SO_4 -Dichtegradientenzentrifugation ausgesetzt und seine Position im Dichtegradienten bestimmt.

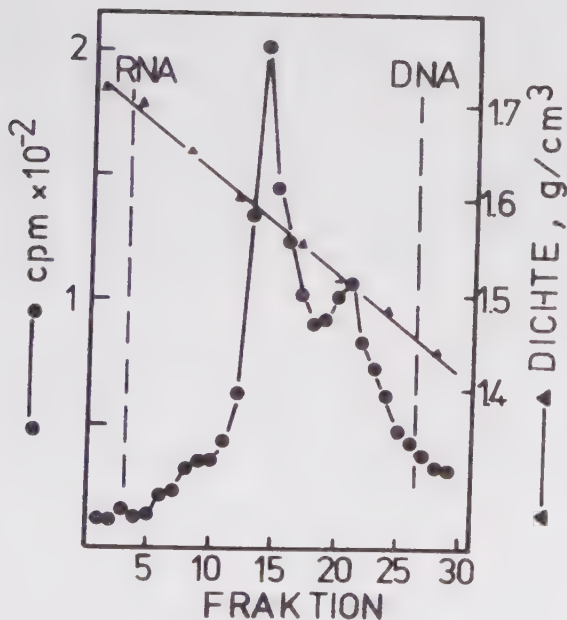


Fig. 37: Dichte des S1-behandelten Rückhybrids. Rückhybrid (wie oben) wurde vor der Dichtegradientenanalyse für 60 Minuten in einem Ansatz mit 0.5 Einheiten S1-Nuklease inkubiert. Anschließend wurde phenolisiert und die wässrige Phase direkt zum Cs_2SO_4 gegeben.

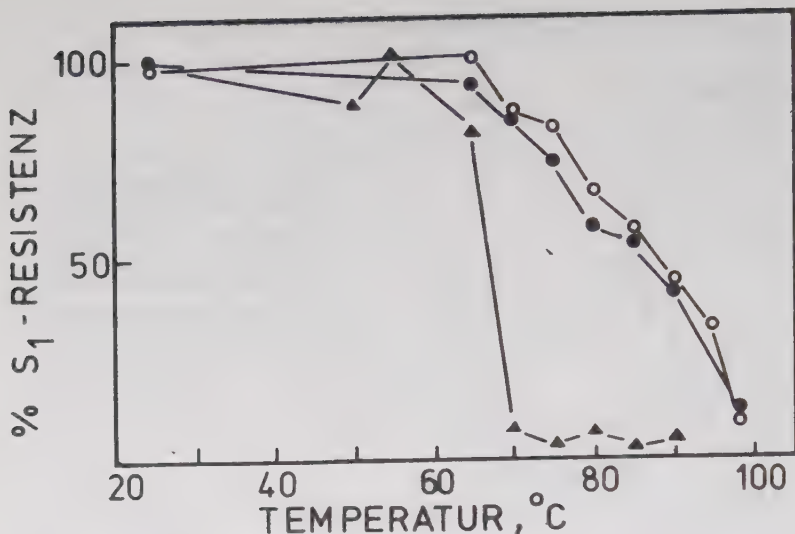


Fig. 38: Schmelzpunktsbestimmung des Rückhybrids aus Globin mRNA und durch Partikelenzym synthetisierter cDNA.

Die Proben (Volumen 30 μ l) enthielten jeweils ca. 6500 cpm Hybrid (DNA-Anteil markiert) in 1 x SSC. Die Gewinnung des Rückhybrids aus Globin mRNA und durch Partikelenzym synthetisierter cDNA wurde in Tab. 17 beschrieben. Die Synthese und Reinigung eines Hybrids aus Globin mRNA und durch AMV-Enzym synthetisierter cDNA erfolgte in analoger Weise. p(A)p(dT), mit radioaktiv markiertem p(dT) wurde in einem Ansatz mit AMV-Enzym, ^3H -dTTP und p(A)-(dT)₁₂ synthetisiert und analog gereinigt. Die Proben wurden in geschlossenen Eppendorffgefäßchen für 2.5 Minuten bei der angezeigten Temperatur inkubiert, dann wurden sehr schnell 500 μ l eiskalter S1-Ansatz (mit 0.2 Einheiten Nuklease) zupipettiert, gemischt, und der S1-Verdau bei 37°C für 60 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde die säureunlösliche Radioaktivität bestimmt. 100% ist das S1-resistente Material, das vor dem S1-Verdau bei Raumtemperatur gestanden hatte. Die Genauigkeit der Temperatureinstellung betrug $\pm 0.5^\circ\text{C}$. $\blacktriangle$ — $\blacktriangle$ p(A)p(dT), $\circ$ — $\circ$ Globin mRNA x cDNA, durch AMV-Enzym synthetisiert, $\bullet$ — $\bullet$ Globin mRNA x cDNA, durch Partikel-Enzym synthetisiert.

In der folgenden Übersicht sind noch einmal kurz die wesentlichen Ergebnisse aus der durch Kombination von Dichtegradientenanalyse und S1-Nukleasebehandlung durchgeführten Untersuchung zusammengefaßt und die Beweisführung skizziert:

Übersicht über die Experimente zur Beweisführung, daß es sich bei dem Partikelenzym um eine echte Reverse Transkriptase handelt.

Stufe	Eigenschaften	zu fördernde Struktur
I gereinigtes Primärprodukt	62% S1-Resistenz, Hybriddichte	
II gereinigtes Primärprodukt nach S1-Beh.	100% S1-Resistenz	
III gereinigtes Primärprodukt nach Alkalibeh.	2.3% S1-Resistenz 96.5% KOH-Resistenz DNA-Dichte, 5 S	
IV Rückhybrid	96% S1-Resistenz Dichte zwischen Hybrid- und RNA-Dichte	
V Rückhybrid nach S1-Beh.	100% S1-Resistenz Hybriddichte, $T_m = 85.5^\circ\text{C}$	

 = markierte DNA,  = unmarkierte RNA

I und II zeigen, daß nach der Reinigung des Primärproduktes der größere Teil der synthetisierten DNA als Hybrid vorliegt. Aus III folgt, daß nach Ablösen der ursprünglichen Template das Produkt als einzelsträngige DNA vorliegt. Diese DNA ist kürzer als die neu hinzugegebenen Globin mRNA Moleküle und läßt sich fast vollständig in ein S1-resistentes Hybrid, mit überstehendem RNA-Anteil überführen (IV). Der überstehende RNA-Anteil kann abverdaut werden und es bleibt ein in exakter Basenpaarung vorliegendes RNA-DNA-Hybrid übrig, das erst bei hoher Temperatur in eine S1-sensitive Form überführt werden kann. Der gefundene Schmelzpunkt entspricht dem eines durch "authentische" Reverse Transkriptase synthetisierten Hybrids aus Globin mRNA und cDNA, und zeigt, daß tatsächlich heteropolymere Sequenzen in exakter Basenpaarung vorliegen. Das Partikelenzym, das die DNA Sequenz synthetisiert hat, ist demnach ohne Zweifel als echte Reverse Transkriptase anzusprechen.

IV. Untersuchungen zur biologischen Herkunft des Enzyms

Wie gezeigt wurde, lassen die Enzym-tragenden Partikel keine Verwandtschaft zu den beiden Gruppen der Hühner-RNA-Tumoviren erkennen. Weiterhin konnte auch das gereinigte Enzym als echte Reverse Transkriptase charakterisiert werden. Im Hühnersystem, wie auch in allen anderen untersuchten Systemen, waren jedoch Reverse Transkriptasen nur in Verbindung mit exogenen oder endogenen RNA-Tumor-Viren (siehe Einleitung) gefunden worden. Es stellte sich nun die Frage, ob das Partikel-enzym das Genprodukt des Polymerasegens einer der beiden Hühner-RNA-Tumovirusgruppen darstellt, oder ob es sich um das Produkt eines nicht-viralen, zellulären Genes handelt. Im folgenden werden zunächst die Unterscheidungsmerkmale gegenüber dem REV-Enzym, dann gegenüber dem ASV/ALV-Enzym besprochen.

1. Vergleich des Partikelenzym mit dem Enzym aus REV

Da für die gereinigte Polymerase aus REV eine deutliche Präferenz für Mn^{++} gegenüber Mg^{++} berichtet worden ist (69), das Partikelenzym jedoch gut mit Mg^{++} arbeitet, wurde die DNA-Synthese an dem synthetischen Homopolymer $p(C)(dG)_{12}$ durch Partikelenzym bzw. REV-Enzym jeweils in Gegenwart von Mg^{++} -Ionen oder Mn^{++} -Ionen gemessen. Das Ergebnis ist in Tab. 18 gezeigt. Während Partikelenzym Mg^{++} gegenüber Mn^{++} deutlich bevorzugt, trifft genau das Gegenteil für das REV-Enzym zu. Dieser deutliche Unterschied wie auch die folgende Sedimentationsanalyse sprechen eindeutig dafür, daß die beiden Enzyme nicht miteinander verwandt sind.

Das gereinigte Partikelenzym wurde einer Band-Sedimentation in Glyceringradienten unterworfen, wobei zur Vermeidung von Aggregaten eine hohe Salzkonzentration benutzt wurde. Als Vergleichsproteine dienten AMV-Reverse

Tab. 18: Präferenz des Partikelenzym und des REV-Enzyms für divalente Kationen.

Reverse Transkriptase aus	Aktivität in Gegenwart von		Verhältnis
	Mg ⁺⁺	Mn ⁺⁺	
Partikeln	13 026	1 821	7.15
REV	468 000	1 082 820	0.15

Gereinigtes Partikelenzym und (nach der gleichen Methode) gereinigtes REV-Enzym wurden jeweils unter Standardbedingungen, in der Gegenwart von p(C)-(dG)₁₂ und ³H-dGTP (8 Ci/mMol) getestet. Die Ansätze enthielten entweder 10 mM Mg⁺⁺ oder 0.1 mM Mn⁺⁺. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten. Die säureunlösliche Radioaktivität des Gesamtansatzes (100 µl) wurde bestimmt. Ein Blindwert von 200 cpm wurde jeweils abgezogen.

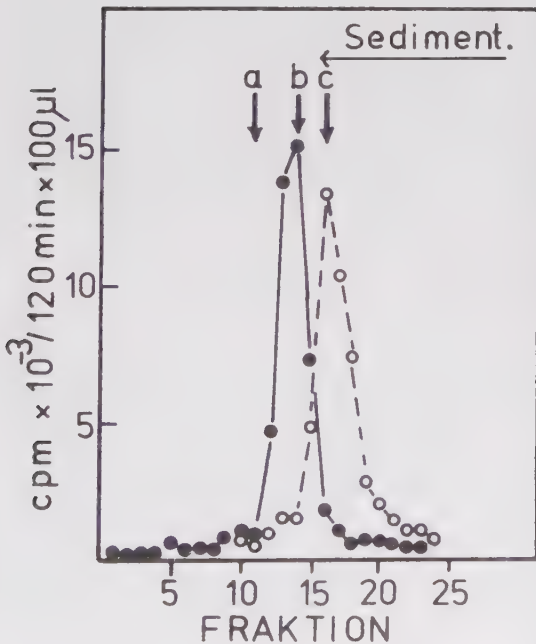


Fig. 39: Sedimentationsanalyse des Partikelenzym.

In parallelen Gradienten (SW 56 Ti; 10-30% Glycerin, 10 mM Phosphatpuffer, pH 8.0, 1 mM DTE, 0.4 M KCl) wurden Partikelenzym, AMV-Enzym, REV-Enzym, Aldolase und Rinderserumalbumin (BSA) für 16.5 Stunden bei 45 000 Upm, 4°C zentrifugiert und anschließend die Gradienten von unten, in jeweils ca. 25 Fraktionen abgenommen. Die Positions-ermittlung für die Polymerasen erfolgte durch Test jeder Fraktion im Reverse Transkriptasetestansatz (p(C)(dG)₁₂; Mg⁺⁺ für Partikel und AMV-Enzym, Mn⁺⁺ für REV-Enzym.) Die Positionsermittlung der anderen beiden Proteine erfolgte durch Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry. ●—● Partikelenzym; ○—○ REV-Enzym; a = Aldolase; b = AMV-Enzym; c = BSA.

Transkriptase, REV-Reverse Transkriptase, jeweils in Parallelgradienten sowie Rinderserumalbumin und Aldolase. Nach dem Lauf wurden die Gradienten fraktioniert und die Positionen der Polymerasen durch Reverse Transkriptasetests, die der übrigen Proteine durch Konzentrationsbestimmung nach Lowry ermittelt. Das Ergebnis ist in der Fig. 39 gezeigt, Partikelenzym befindet sich zwischen Rinderserumalbumin und Aldolase an der gleichen Stelle wie AMV-Enzym, sedimentiert also mit ca. 7 S. Es ist deutlich größer als das REV-Enzym, welches an der Stelle von BSA bandiert.

2. Vergleich des Partikelenzym mit der Reversen Transkriptase der ASV/ALV-Gruppe

a) Immunologischer Vergleich

Für die ALV/ASV-Gruppe ist bekannt, daß die Reversen Transkriptasen aller Viren - einschließlich der endogenen - identisch sind (vgl. Tab. 21). Mit IgG, das gegen das Enzym eines Virus (z.B. AMV) gerichtet ist, können die Enzyme aller Viren der Gruppe gleichartig inaktiviert werden. Der IgG-Neutralisationstest eignet sich daher ausgezeichnet, um eine Reverse Transkriptase in Bezug auf Zugehörigkeit zur ALV/ASV-Gruppe zu klassifizieren. Es wurde daher untersucht, ob das Partikel-Enzym durch Anti-AMV-Polymerase-IgG inaktiviert werden kann. Hierzu standen zwei IgG-Präparationen aus verschiedenen Tieren, die mit AMV-Polymerase immunisiert worden waren, sowie eine IgG-Kontrollpräparation von einem Tier vor Immunisierung zur Verfügung.

Der erste Vergleich der Inaktivierung von AMV und Partikel-Enzym zeigt (Tab. 19; Fig. 40 a-d), daß die beiden Enzyme nicht identisch sind. In drei von vier Experimenten wurde wie auch später reproduzierbar bei Partikel-Enzym eine wenigstens 34-fach höhere IgG-Menge benötigt, wenn eine Inaktivierung auf 50% Aktivität erreicht werden sollte. Um zu entscheiden, ob die durch diese IgG-Mengen erzielbare Inaktivie-

Tab. 19: IgG-Neutralisationstest der verschiedenen Partikel-enzympräparationen.

Präparation Nr.	Enzym aus	100% Aktivität cpm/60 Min	50% Inh. µg IgG	Relation
1	Partikel	2027	20.89	8.74
	AMV	6500	2.39	
2	Partikel	9150	158	34.5
	AMV	45000	4.57	
3	Partikel	3122	109.6	55
	AMV	49900	1.99	
4	Partikel	9150	83	59.2
	AMV	45500	1.4	

Konstante Mengen Enzym wurden mit steigenden Mengen IgG aus einer Verdünnungsreihe gemischt und in einem Reaktionsvolumen von 50 µl, in Gegenwart von 160 mM KCl, 0.4 mM DTE, 4 mM Phosphat, pH 8, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 14% Glycerin, 50 µg BSA/50 µl, für 15 Minuten bei 37°C präinkubiert. Anschließend wurde eine Stammlösung die p(C)(dG)₁₂, ³H-dGTP und die fehlenden Ionen enthielt, zugegeben, und die Restaktivität bestimmt. Die Inkubation war für 60 Minuten bei 37°C. Ansätze ohne zugesetztes IgG dienten als 100% Kontrolle. Durch parallele Experimente wurde sichergestellt, daß weder Partikelenzym noch AMV-Enzym durch Normal-IgG (IgG der präimmunisierten Ratte) gehemmt wurden. Die IgG-Mengen für die 50%ige Inhibierung wurden aus den Neutralisationskurven (Fig. 40 a-d) abgelesen.

zung auf einer spezifischen Kreuzreaktion oder auf anderen Effekten beruht, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Es baute auf der Beobachtung auf, daß beide Anti AMV-Präparationen einen identischen Hemmeffekt auf AMV-Enzym zeigten (Fig. 41 A,B). Beim Vorliegen einer spezifischen Kreuzreaktion sollten deshalb beide Präparationen auch auf das Partikel-Enzym einen identischen Effekt haben. Ein entsprechendes Ergebnis läßt sich aber nicht erreichen (Fig. 42), obwohl auf strenge Standardisierung geachtet wurde. So wurde jeweils eine Verdünnungsreihe der IgG-Präparationen für beide Enzyme ver-

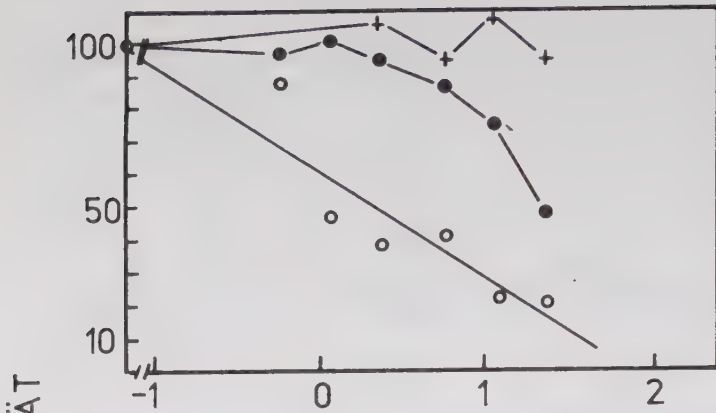
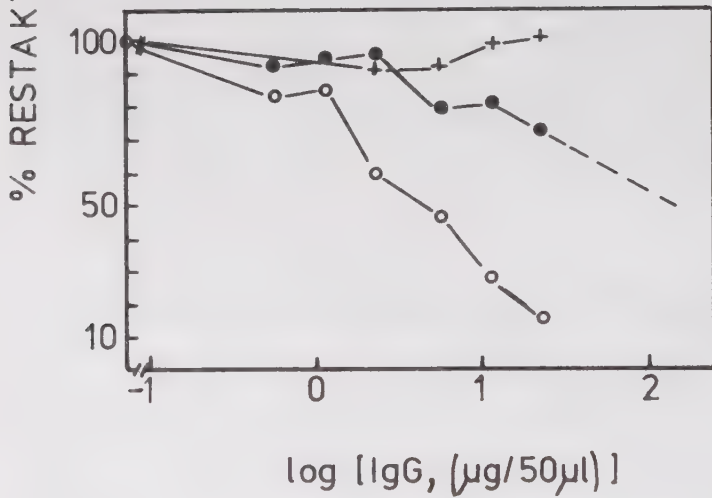


Fig. 40 a



40 b

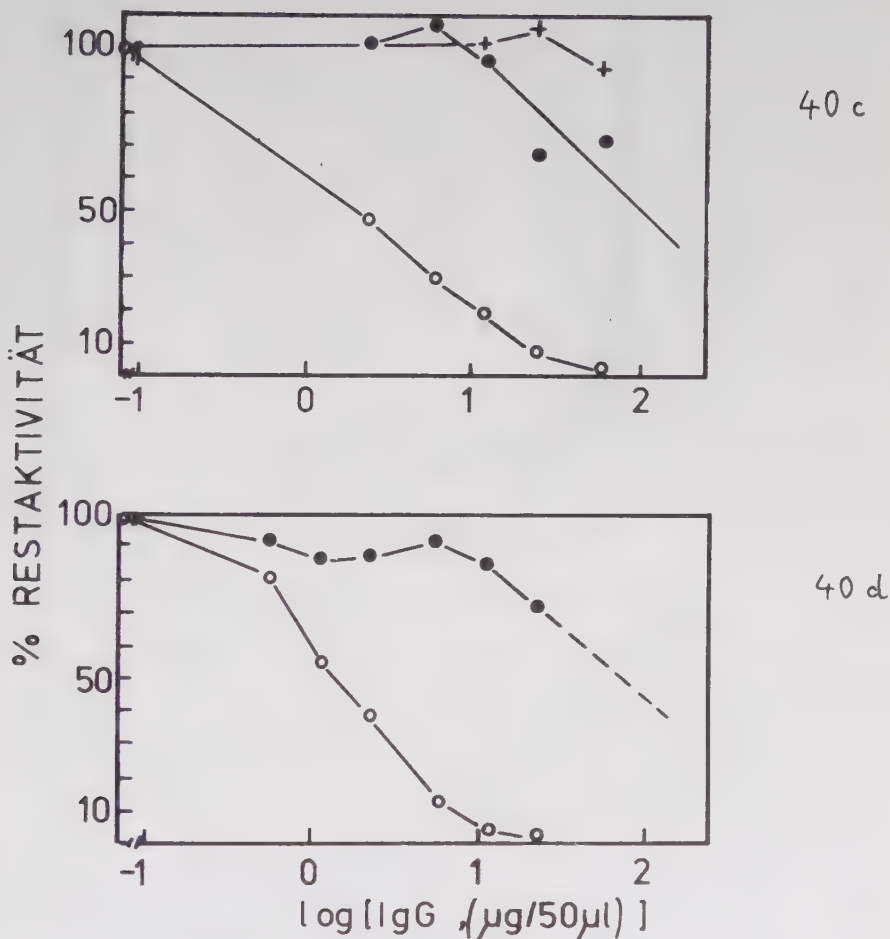


Fig. 40 a-d: Test der Hemmbarkeit von Partikelenzym durch Anti-AMV-Polymerase-IgG.

Die Experimente mit verschiedenen Präparationen von Partikelenzym wurden wie in der Legende zu Tabelle 19 beschrieben, durchgeführt. Die Restaktivität wurde bestimmt und gegen den Logarithmus der IgG-Konzentration pro Test aufgetragen. ○—○ AMV-Enzym + Anti-AMV-Polymerase-IgG; ●—● Partikelenzym + Anti-AMV-Polymerase-IgG; + — + Partikelenzym + Normal-IgG.

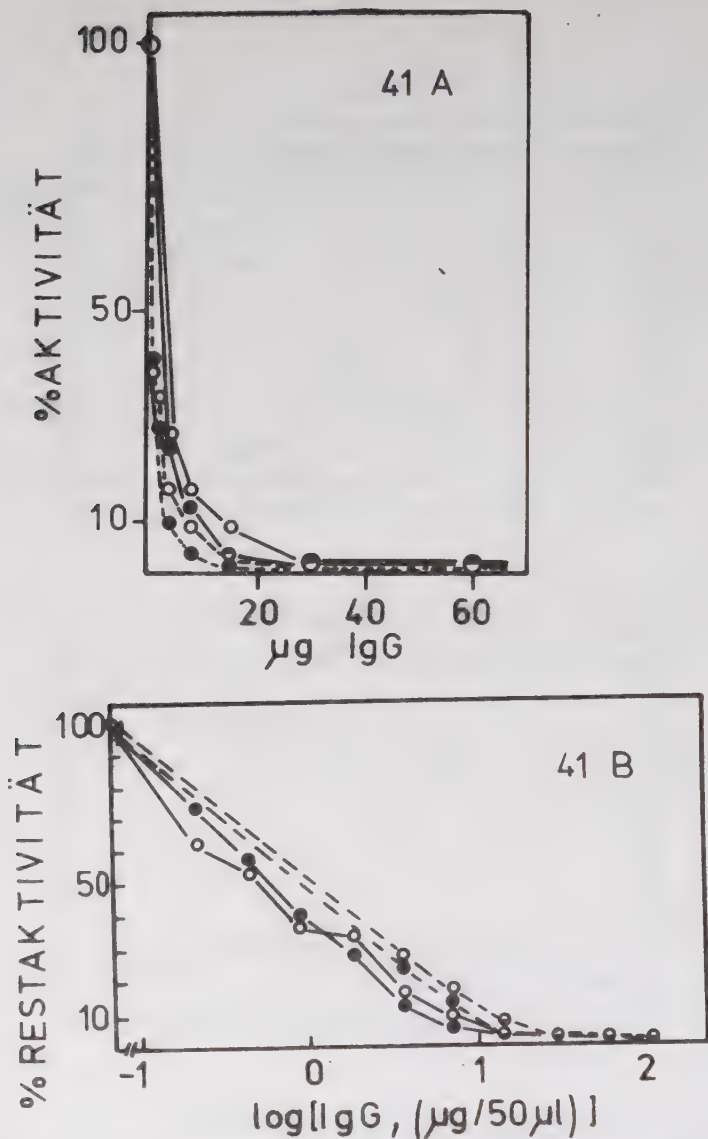


Fig. 41 A u. B: Vergleich der Hemmwirkungen der IgG-Präparationen I und II auf AMV-Enzym (Standardisierung).

Steigende Mengen IgG wurden jeweils mit gleichen Mengen AMV-Enzym unter den in Tab. 19 angegebenen Bedingungen präinkubiert und die Restaktivität durch Standardpolymerisationsansätze bestimmt. Die Figur zeigt zwei unabhängig voneinander durchgeführte Parallelversuchsreihen.

Experiment 1: $\circ-\circ$ IgG I, $\bullet-\bullet$ IgG II; Exp. 2: $\circ---\circ$ IgG I, $\bullet---\bullet$ IgG II. Fig. 41 A zeigt die Hemmkurven in der (anschaulicheren) linearen Darstellung. Fig. 41 B zeigt die gleichen Ergebnisse in halblogarithmischer Auftragsweise.

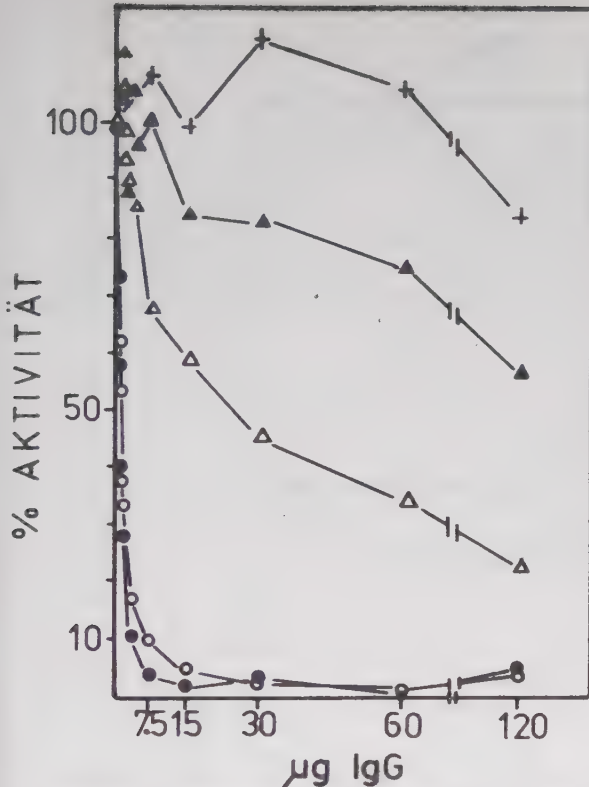


Fig. 42 A: IgG-Neutralisationstest.

Konstante Mengen Partikelenzym oder AMV-Enzym wurden mit steigenden Mengen IgG in 50 µl-Ansätzen für 12 Stunden bei 40°C inkubiert. Die Bedingungen waren: 160 mM KCl, 0.4 mM DTE, 4 mM Phosphat, pH 8, 10 mM Tris-HCl, pH 8, 14% Glycerin, 50 µg BSA/50 l. Nach der Inkubation wurden die Ansätze durch Zugabe von 50 µl aus einem Gemisch auf die Bedingungen des Standardreaktionsansatzes gebracht und die p(C)-(dG)₁₂-abhängige DNA-Polymerasereaktion gemessen. Aufgetragen sind Restaktivität gegen Menge IgG im Ansatz.

○—○ AMV-Enzym/Anti-IgG I;
 △—△ Partikelenzym/Anti-IgG I;
 ●—● AMV-Enzym/Anti-IgG II;
 ▲—▲ Partikelenzym/Anti-IgG II;
 + —+ Partikelenzym/Normal-IgG.

wendet, es wurde ein "master mix" für alle Reaktionen benutzt, etc.. Man erkennt, daß die IgG-Präparationen I und II nur auf das AMV-Enzym, nicht aber auf das Partikel-Enzym einen identischen Effekt haben. Präparation I führt bei einem 43-fachen, Präparation II erst bei einem 251-fachen Überschuß zu 50% Inaktivierung (Tab. 20). Hieraus ergibt sich, daß der Hemmeffekt durch IgG I, sofern er jenen von IgG II übertrifft, keine spezifische Kreuzreaktion ist. Der schwächere Hemmeffekt von IgG I kann als Ausdruck einer spezifischen Kreuzreaktion gewertet werden. Wahrscheinlich ist jedoch auf Grund eigener Experimente, daß eine geringe Kontamination des Immunisierungsmaterials mit Partikel-Enzym die Ursache der schwachen und unterschiedlichen Effekte der beiden Präparationen ist. Ein Vergleich der Verhältniszahlen in Tab. 13 (1:43 bis 1:251) zu den Verhältniszahlen in Tab. 14 (1:1 bis 1:11,5) für die Reversen Transkriptasen weit entfernter Tumoviren zeigt in jedem Fall deutlich, daß immunologisch höchstens von einer Verwandtschaft "um fünf Ecken" gesprochen werden kann.

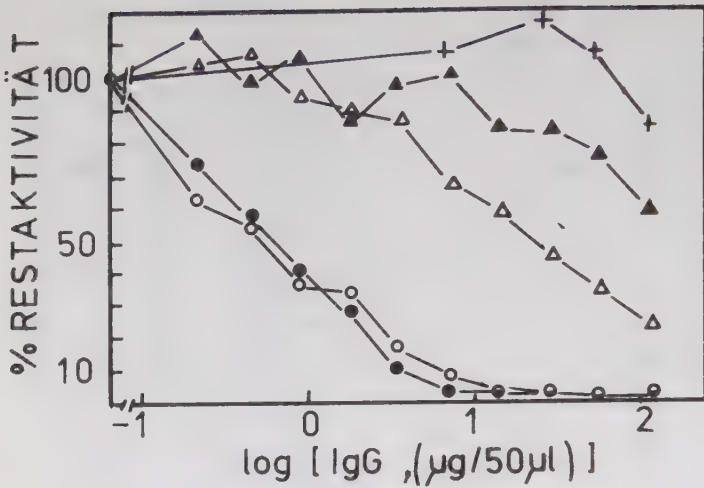


Fig. 42 B: Darstellung der in Fig. 42 A gezeigten Experimente in halblogarithmischer Darstellung.

Tab. 20: 50%ige Inhibierung durch die beiden IgG-Präparationen.

IgG Präparation	Enzym aus	100% Akt.	µg IgG für 50% Inakt.	Relation
I	Partikel	13 100	21.8	43.6
	AMV	18 400	0.53	
II	Partikel	13 100	158	251
	AMV	18 400	0.63	

Die Werte wurden aus Figur 42 B entnommen. Die 100% Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

Tab. 21: IgG-Neutralisationstest zur Unterscheidung verwandter und nicht-verwandter Reverse Transkriptasen.

IgG gerichtet gegen die Poly- merase von:	Herkunft der getesteten Rev. Transkript.	µg IgG für 50% Inhibierung	Verhältnis*	Autoren
MuLV	MuLV	2	1 : 11.5	Scolnick et al. (40)
	FeLV	23		
	FeLV	7	1 : 4.2	
	MuLV	30		
MuLV	MuLV	2.1	1 : 9.2	Todaro und Gallo (102)
	Gibbon ape LSV	19.4		
AMV	AMV	3.5		Nowinski et al. (78)
	SR - RSV	3.5		
	B 77	3.5	1 : 1	
	BHT (RAV-2)	3.5		
	RAV-2			
AMV	RSV	3		Mizutani und Temin (79)
	ILV - UV	2		
	RAV - O	2		

* Angegeben ist das Verhältnis der IgG-Mengen für 50% Inhibierung für homologe Reverse Transkriptase zu getesteter Reverse Transkriptase.

b) Vergleich der K_M -Werte von Partikelenzym und AMV-Enzym bezüglich dTTP und dGTP

Die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration ist charakteristisch für jedes Enzym. Die Substratkonzentration, bei der halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird, ist durch die Michaelis-Konstante (K_M) gekennzeichnet und eignet sich gut zur Charakterisierung von Enzymen. Es wurden deshalb die Michaelis-Konstanten für die beiden Substrate dTTP und dGTP, jeweils für Partikelenzym und AMV-Enzym, in der von synthetischen Homopolymeren abhängigen Reaktion vergleichend gemessen. Für parallele Versuchsreihen wurden jeweils dieselben Stamm-lösungen und Verdünnungsstufen von markierten und unmarkierten Deoxynukleosidtriphosphaten für die parallelen Versuchsreihen verwendet. Die Reaktionen erfolgten unter Standardbedingungen, jeweils mit Template-Primer im Sättigungsbereich und bei 37°C. Durch kinetische Messung wurde sichergestellt, daß nur zeitlich lineare Reaktionen zur Auswertung verwendet wurden. Die Radioaktivitätsmessungen wurden mit Szintillationslösung gleicher Effizienz und mit dem jeweils gleichen Szintillationszähler durchgeführt. Unter den verwendeten Bedingungen (Nitrocellulosefilter von Millipore, 100 µg BSA pro Filter, waschen mit 5% TCE + Pyrophosphat, Toluolszintillator) ergab sich die Relation 1 µCi = 620 000 cpm, was bedeutet, daß 28% der theoretisch auftretenden radioaktiven Zerfälle erfaßt wurden.

Die Reaktionsgeschwindigkeit wurde gemessen als

$$\frac{\text{Einbau pMol}}{\text{min} \cdot \text{ml}} = \frac{\text{cpm}}{t \cdot \text{vol}} \cdot \frac{K_s}{R \cdot 620\,000}$$

wobei K_s die eingesetzte Substratmenge in pMol und R die Gesamtradioaktivität in µCi bedeuten.

Der Vergleich der während der Testzeit eingebauten Deoxynukleotidtriphosphatmenge mit der pro Ansatz jeweils angebotenen Menge zeigt, daß die durch den Einbau verringerte Substratkonz-

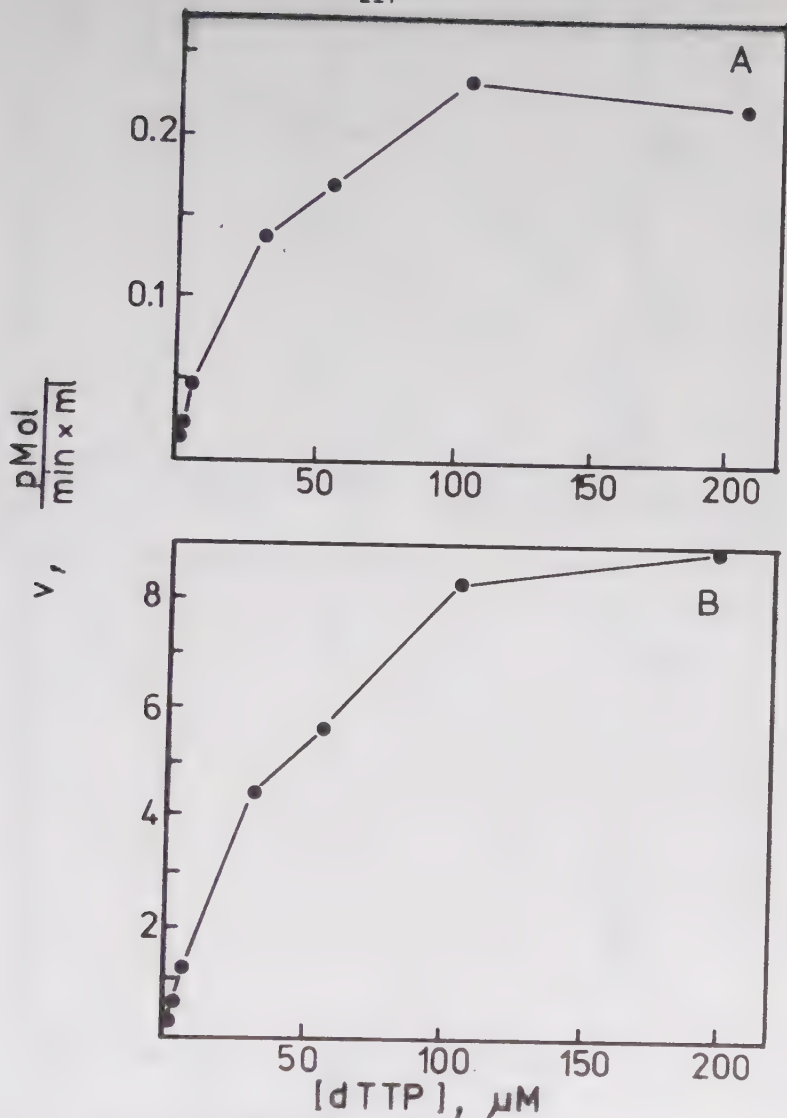


Fig. 43 A und B: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration an Substrat (dTTP). (Michaelis-Menten-Darstellung.)

Konstante Mengen Partikelenzym (A) bzw. AMV-Enzym (B) wurden in Standardreaktionsansätzen mit p(A)(dT)_{12} als Template-Primer-Komplex (2 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) und verschiedenen Mengen an markiertem und unmarkiertem dTTP inkubiert und die Reaktion kinetisch gemessen. Anhand der eingesetzten Mengen konnte die jeweilige Substratkonzentration und die Reaktionsgeschwindigkeit berechnet und gegeneinander aufgetragen werden.

Die durch das Partikelenzym katalysierte Reaktion wurde für 2 Stunden, die AMV-Enzym-abhängige Reaktion für 25 Minuten verfolgt.

Der Einbau pro Minute wurde auf einen Ansatz von 1 ml bezogen.

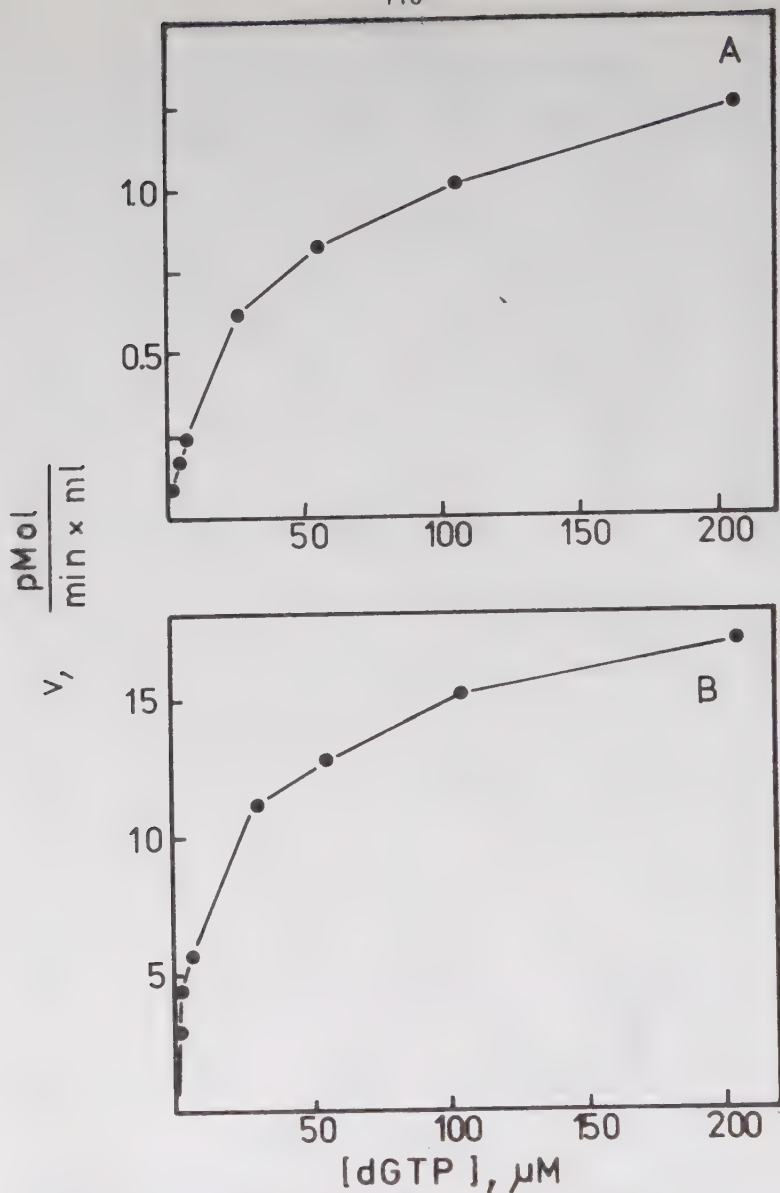


Fig. 44 A und B: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Konzentration an Substrat (dGTP). (Michaelis-Menten-Darstellung.)

Das Experiment wurde, wie in der Legende zu Figur 26 A und B beschrieben, durchgeführt; die Ansätze enthielten jedoch p(C)(dG)_{12} als Template-Primer-Komplex und ^3H -dGTP in verschiedener Konzentration.

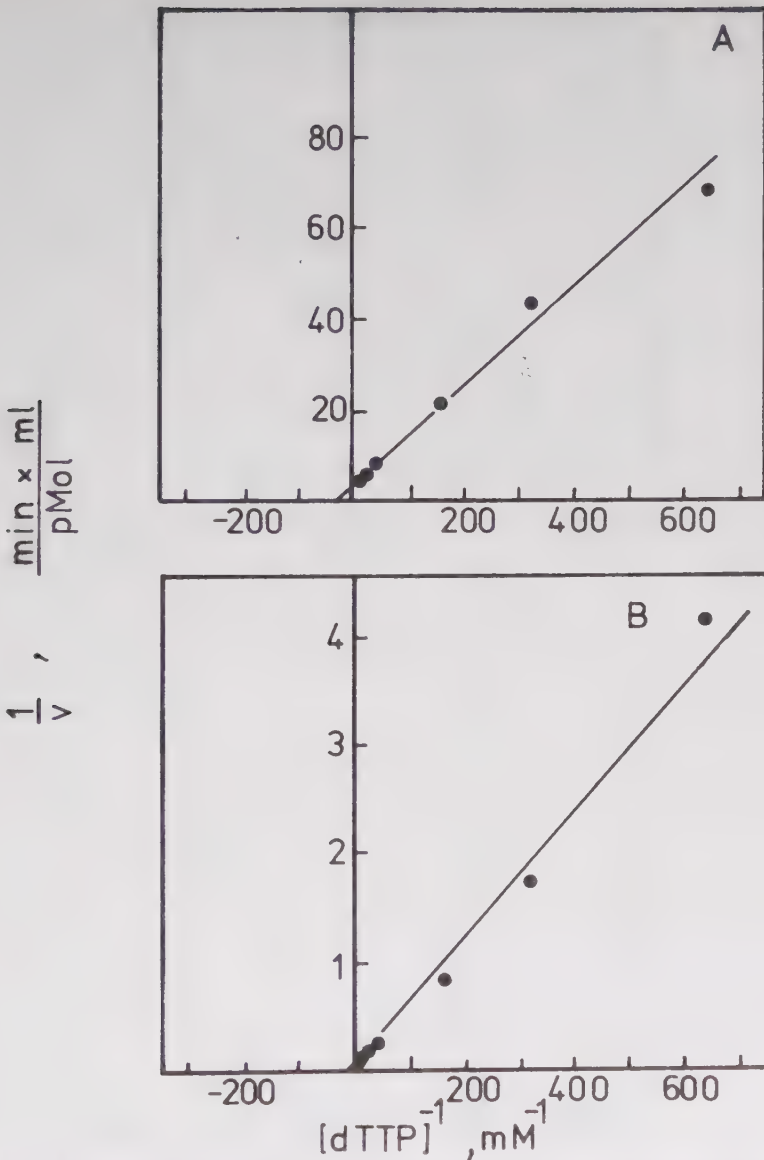


Fig. 45 A und B: Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung der Michaeliskonstante (K_M) für das Substrat dTTP für Partikelenzym (A) und AMV-Enzym (B).

Die Kehrwerte der in Figur 26 A und B gezeigten Größen wurden gegeneinander aufgetragen. Der Schnittpunkt der Geraden mit den Abszissen entsprechen $-1/K_M$.

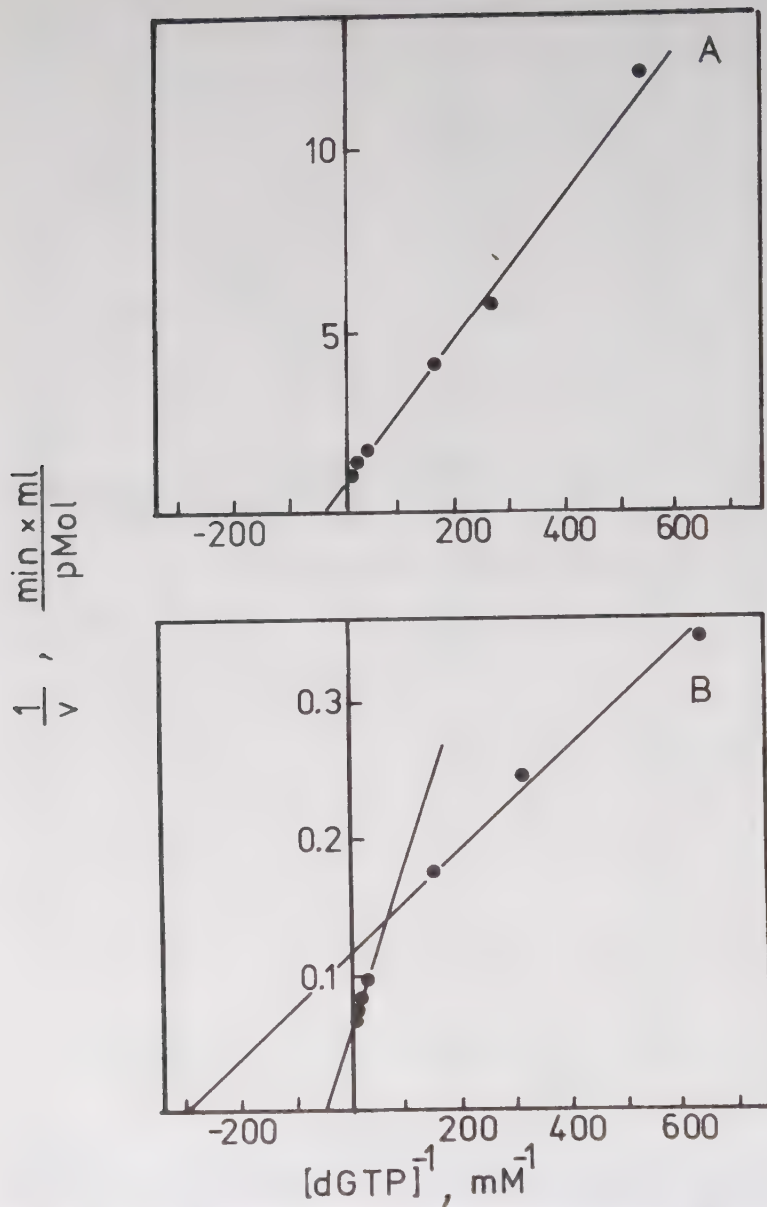


Fig. 46 A und B: Lineweaver-Burk-Diagramm zur Bestimmung der Michaeliskonstante (K_M) für das Substrat dGTP für Partikelenzym (A) und AMV-Enzym (B). Die Kehrwerte der in Figur 27 A und B eingezeichneten Größen wurden gegeneinander aufgetragen. Der bzw. die Schnittpunkte der Geraden mit den Abszissen entsprechen $-1/K_M$.

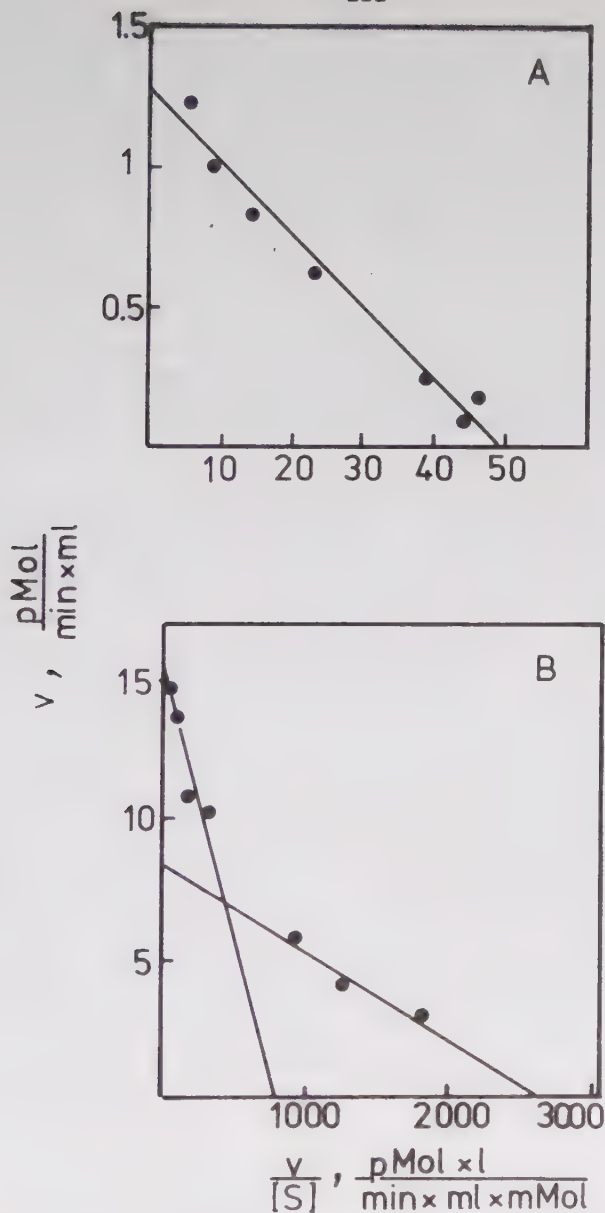


Fig. 47 A und B: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von Partikelenzym bzw. AMV-Enzym von der Substratkonzentration.

Darstellung im Eadie-Hofstee-Diagramm. Die Werte des in Figur 44 und 46 aufgezeigten Experimentes wurden verwendet, und v gegen v/S aufgetragen. A = Partikelenzym; B = AMV-Enzym.

zentration in allen Fällen kleiner als 5% war, d.h. die Substratkonzentration während des Testes kann tatsächlich als konstant betrachtet werden. Dies steht in gutem Einklang mit der beobachteten Linearität der Reaktionen. In den folgenden Abbildungen sind zunächst die Ergebnisse in der Michaelis-Menten-Darstellung, d.h. als Substratkonzentration gegen Reaktionsgeschwindigkeit aufgetragen. Vergleicht man den Kurvenverlauf für das Substrat dTTP bei Partikel-Enzym und AMV-Enzym, so erkennt man eine große Ähnlichkeit (Fig. 43). Für das Substrat dGTP zeigt sich allerdings ein deutlicher Unterschied (Fig. 44). Während die Kurve für Partikelenzym ähnlich verläuft wie die Kurven für das Substrat dTTP, zeigt sich bei AMV-Enzym eine andere Charakteristik: Die Kurve steigt im Bereich kleiner Substratkonzentrationen steil an, um dann mit verminderter Steigung weiterzulaufen. Diese Unterschiede zeigen sich deutlicher, wenn der Vorgang mit Lineweaver-Burk-Diagramm, d.h. Kehrwert der Reaktionsgeschwindigkeit gegen Kehrwert der Substratkonzentrationen aufgetragen wird. Für das Substrat dTTP ergeben sich Gerade für beide Enzyme (Abb. 45); für dGTP ergibt sich eine Gerade nur bei Partikel-Enzym, während die Zweiphasigkeit der Michaelis-Menten-Darstellung für AMV-Enzym sich durch das Auftreten von zwei Geraden ausdrückt (Fig. 46). Die aus den Schnittpunkten der Geraden mit der X-Achse errechneten K_M -Werte sind in Tab. 22 aufgeführt. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Enzymen ist darin zu erkennen, daß nur das AMV-Enzym bei sinkender Konzentration des Substrats dGTP von einer hohen (20 μM) auf eine niedere (3,3 μM) Michaelis-Konstante "umschaltet". Der Unterschied zwischen "einphasiger" Kurve für Partikelenzym und "zweiphasiger" Kurve für das AMV-Enzym wird noch deutlicher, wenn man die in ihrer Auflösungsfähigkeit schärfere Darstellung nach Eadie-Hofstee verwendet (Fig. 47 A u. B).

Tab. 22: K_M -Werte für dTTP und dGTP.

Enzym aus	Substrat	K_M (μM)
Partikel	dTTP	28
	dGTP	25
AMV	dTTP	57
	dGTP	3.3; 20;*

Die Werte wurden aus den Lineweaver-Burk-Diagrammen ermittelt. Bei dem Wert für dGTP und AMV-Enzym (*) wurden die Schnittpunkte beider Geraden zur Berechnung von K_{M1} und K_{M2} herangezogen.

c) Vergleich der thermischen Inaktivierungskinetiken

Ein weiterer Unterschied ergibt sich bei der thermischen Inaktivierung der Enzyme. Die verbleibende Restaktivität nach Präinkubation bei 48°C und 55°C ist in Fig. 48 wiedergegeben. Das Partikel-Enzym erweist sich stabiler als das AMV-Enzym. Bestimmt man aus Fig. 48 die Zeitdauer der Präinkubation, welche für eine Inaktivierung auf 50% notwendig ist (Tab. 23), so ergeben sich bei 48°C und 55°C jeweils ca. 3-fach längere Zeiten für das Partikel-Enzym.

Tab. 23: Thermische Inaktivierung von AMV- bzw. Partikel-enzym.

Enzym aus	Temperatur (°C)	Zeit für 50%ige Inaktivierung (Min)
Partikel	48	11
	55	2
AMV	48	3
	55	0.7

Die Werte für die 50%ige Inaktivierung wurden aus Fig. 48 entnommen.

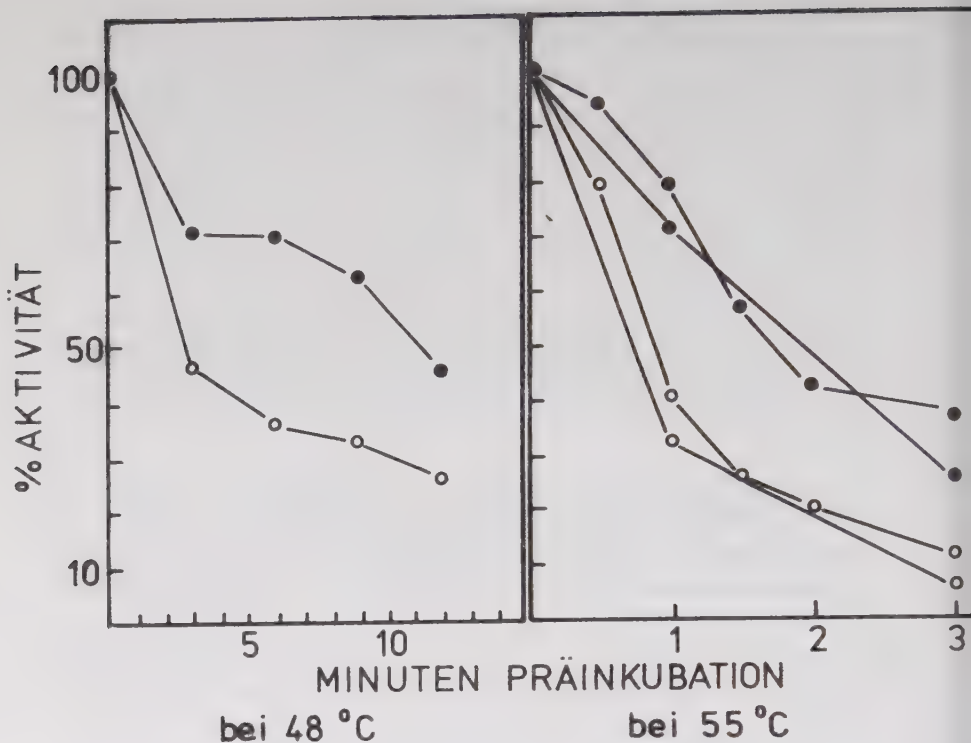


Fig. 48 A und B: Thermische Inaktivierung von Partikelenzym und AMV-Enzym.

Die gereinigten Enzyme wurden unter den Bedingungen des Aufbewahrungspuffers (10 mM Phosphatpuffer, pH 8.0, 0.2 M KCl, 0.5 mg/ml BSA, 0.5 mM DTE, 50 Vol.% Glycerin) bei 48°C (Fig. 48 A) bzw. bei 55°C (Fig. 48 B) für die angegebenen Zeiten präinkubiert und anschließend in einem Standardreaktionsansatz (mit p(C)(dG)₁₂ bei 37°C für eine Stunde weiterinkubiert. Der Einbau von ³H-dGMP in säureunlösliches Material pro 100 µl wurde bestimmt und ein Blindwert von 200 cpm abgezogen. 100% waren jeweils die Einbauten in den Ansätzen ohne Präinkubation.

●—● Partikelenzym (100% = 5169 cpm); ○—○ AMV-Enzym (100% = 181 834 cpm)

d) Vergleich der Empfindlichkeit gegen nicht-ionische Detergenzien

Der von Wu und Cetta (105) beschriebene stimulierende Effekt von nicht-ionischen Detergenzien auf gereinigte Reverse Transkriptase wurde für NP 40 und Triton X 100 am AMV- und Partikel-Enzym überprüft. Wie Fig. 49 zeigt, wird die Aktivität des AMV-Enzyms nicht beeinflusst, während jene des Partikel-Enzyms auf 60-70% absinkt. Da die zu vergleichenden Enzyme unter identischen Bedingungen gereinigt worden waren, kann der im Experiment sichtbare Effekt wiederum dadurch erklärt werden, daß es sich bei Partikel-Enzym und AMV-Enzym um voneinander verschiedene Proteine handelt. Das Ausbleiben des stimulierenden Effektes auf das AMV-Enzym in unserem Experiment, das im Gegensatz zu den Befunden von Wu und Cetta steht, hat möglicherweise seine Ursache in den unterschiedlichen Reinigungsmethoden.

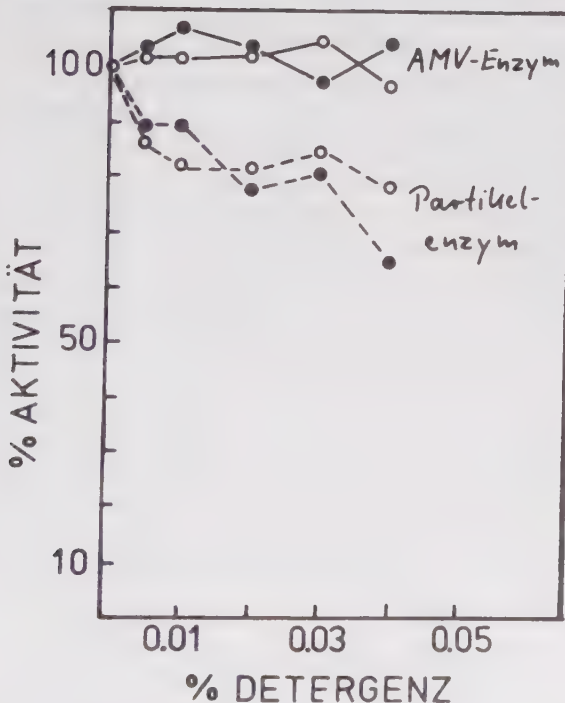


Fig. 49: Einfluß von Detergenzien auf Partikel-Enzym und AMV-Enzym.

Standardreaktionsansätze mit p(C)(dG)₁₂ wurden mit konstanten Mengen Partikel-Enzym bzw. AMV-Enzym gemischt. Sie enthielten die angegebenen Konzentrationen (Volumenprozent) an Detergenzien. Der Einbau pro 100 µl/60 Minuten wurde bestimmt und die Aktivität auf die Werte ohne Detergenz als 100% bezogen.

● Triton X 100
○ NP 40

e) Vergleichende Optimierung der Reaktionsbedingungen für Partikel-Enzym und AMV-Enzym (Temperatur, pH, Mg^{++} -Optimum, K^{+} -Optimum)

Die folgenden Bedingungen des Reaktionsansatzes wurden jeweils getrennt variiert: Temperatur, pH, sowie die Konzentration von Kalium- und Magnesium-Ionen. Als Matrice diente bei diesen Experimenten $p(C)(dG)_{12}$; bei der Variation der Mg^{++} -Ionen-Konzentration wurde auch $p(A)(dT)_{12}$ verwendet. Die Experimente wurden jeweils parallel mit AMV-Enzym durchgeführt, um auch auf der deskriptiven, enzymologischen Ebene einen Vergleich des Partikel-Enzyms mit einer repräsentativen Reversen Transkriptase der AMV/RSV-Gruppe zu erhalten. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse dieser vergleichenden Charakterisierungen. Die Einbauwerte wurden teilweise aus Kinetiken, teilweise aus Endpunktsbestimmungen erhalten. Endpunktsbestimmungen wurden nur dann verwendet, wenn aus Vorexperimenten bekannt war, daß die Reaktion unter den gewählten Bedingungen linear bis zum gewählten Endpunkt der Messung verläuft. Alle Experimente wurden mehrfach durchgeführt, wobei auf eine weitgehende Standardisierung der zu vergleichenden Ansätze Wert gelegt wurde. Die größten Einbauwerte wurden jeweils als 100% definiert. 100% Aktivität sind für das Partikel-Enzym zwischen 4000 und 12 000 cpm/100 μ l Reaktionsansatz, je nach verwendeter Enzymfraktion (Kurve A ●—●). Für die vergleichende Optimierung des AMV-Enzyms konnten höhere Aktivitäten verwendet werden (Kurve B o---o). Während die Optimierungskurven für die Temperatur (Fig. 50) und den pH-Wert (Fig. 51) praktisch gleich verlaufen, ergeben sich Unterschiede für die optimale Kalium- und Magnesium-Ionen-Konzentration (Fig. 52-55).

Bei Verwendung des Template-Primer-Komplexes $p(A)(dT)_{12}$ ist der Unterschied zwischen den Mg^{++} -Optimumskurven weniger ausgeprägt als bei Verwendung von $p(C)(dG)_{12}$. Daraus folgt, daß Optimumskurven nur für den Template-Primer-Komplex gelten, mit dem die Messungen durchgeführt wurden, und sich nicht vorbehaltlos auf andere Template-Primer übertragen lassen.

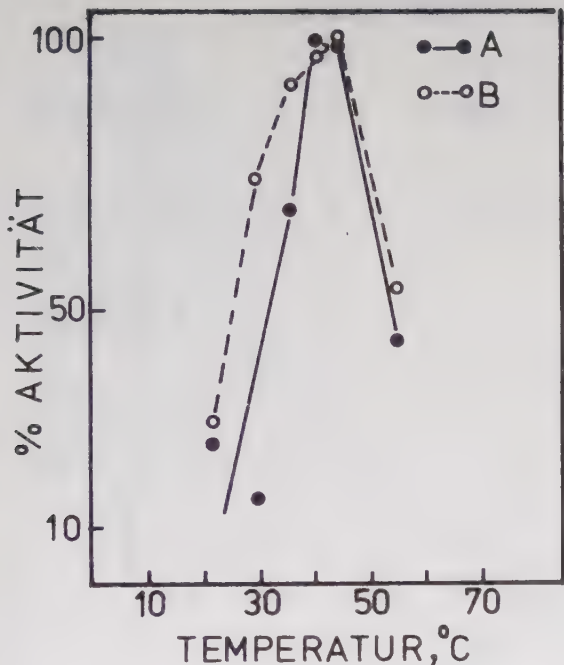


Fig. 50: Bestimmung des Temperaturoptimums.

Standardreaktionsansätze (mit $p(C)(dG)_{12}$) wurden mit AMV-Enzym oder Partikel-Enzym parallel bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Die Reaktionen wurden kinetisch gemessen. Die Werte im linearen Bereich wurden für die Auswertung verwendet. Die Mg^{++} -Konzentration betrug 10 mM, die K^+ -Konzentration 60 mM, pH war 8.3.

100% Aktivität sind 275000 cpm für AMV, 2500 cpm für Partikelenzym.

Verwendet wurde der Einbau bis 60 Minuten für Partikel-Enzym, bis 15 Minuten für AMV-Enzym.

A = Partikel-Enzym
B = AMV-Enzym

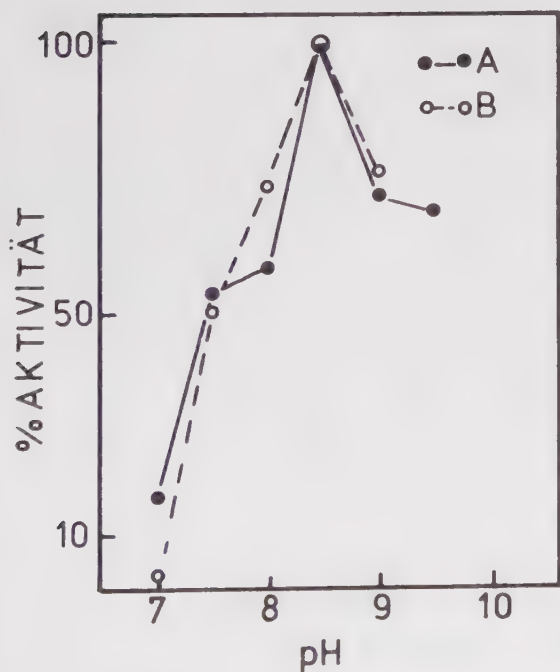


Fig. 51: Bestimmung des pH-Optimums.

Standardansätze mit $p(C)-(dG)_{12}$ wurden unter Verwendung verschieden eingestellter Puffer hergestellt. Die K^+ -Konzentration betrug 40 mM, Mg^{++} betrug 10 mM, die Temperatur 37°C. Die Reaktion lief für 4 Stunden.

100% Aktivität sind 117 000 cpm für AMV-Enzym, 10 321 cpm für Partikel-Enzym.

A = Partikel-Enzym
B = AMV-Enzym

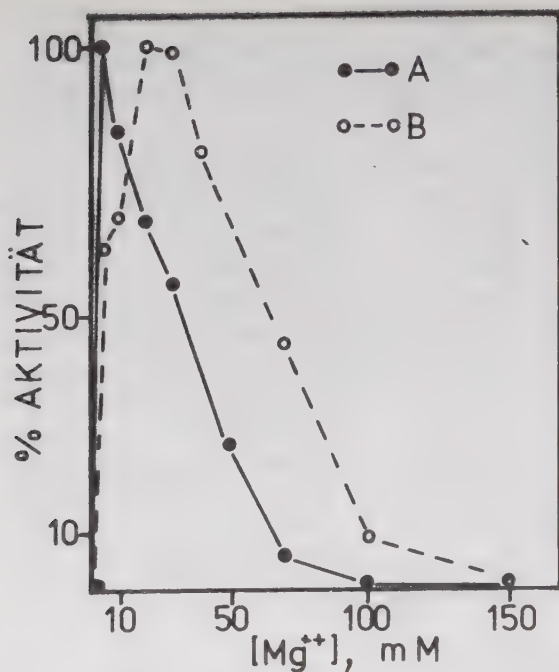


Fig. 52: Bestimmung des Mg^{++} -Ionen-Optimums bei 40 mM K^+ .

Standardreaktionsansätze mit $p(C)(dG)_{12}$ wurden parallel mit AMV-Enzym bzw. mit Partikel-Enzym ange-
setzt. Die Temperatur be-
trug 37°C, pH war 8.3, die
 K^+ -Konzentration betrug
40 mM. Inkubiert wurde 2
Stunden.

100% Aktivität sind für
AMV, 529 000 cpm, für
Partikel-Enzym 9800 cpm.
Die Mg^{++} -Konzentration
wurde, wie angegeben,
variiert.

A = Partikel-Enzym
B = AMV-Enzym

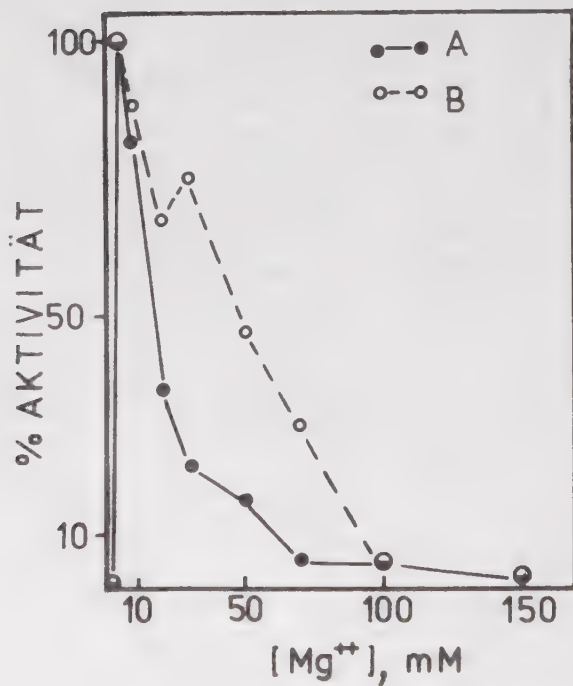


Fig. 53: Bestimmung des Mg^{++} -Optimums bei 80 mM K^+ .

Bedingungen wie in der vor-
hergehenden Figur 52 ledig-
lich die K^+ -Konzentration
ist auf 80 mM erhöht.

A = Partikel-Enzym
B = AMV-Enzym

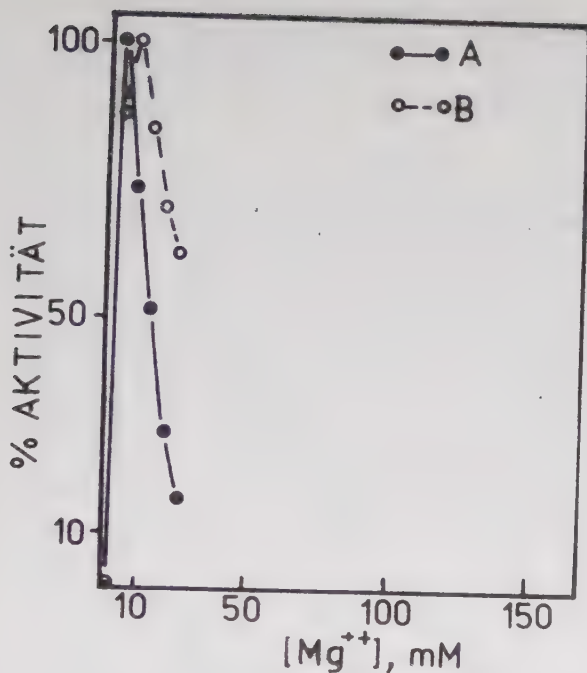


Fig. 54: Bestimmung des Mg^{++} -Ionenoptimums.

Bedingungen wie in Fig. 52, jedoch $p(A)(dT)_{12}$ als Template-Primer-Komplex. 100% sind 12 500 für AMV-Enzym, 1642 cpm für Partikel-Enzym. A = Partikel-Enzym B = AMV-Enzym

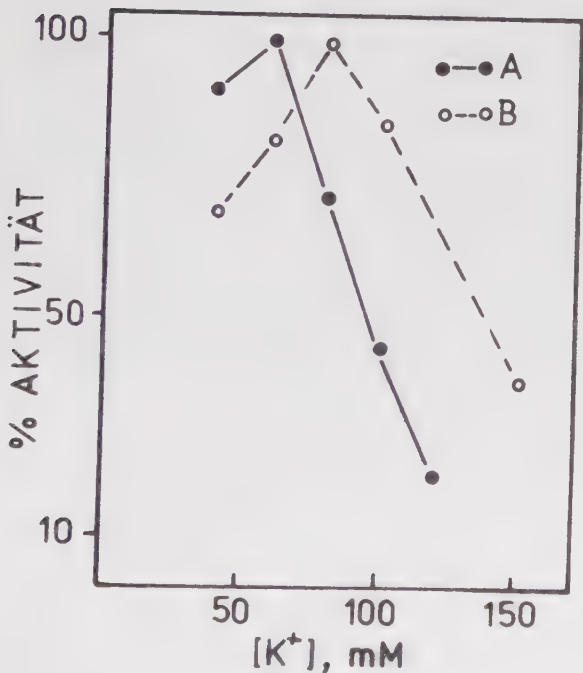


Fig. 55: Bestimmung des K^{+} -Ionenoptimums.

Standardreaktionsansätze mit $p(C)(dG)_{12}$ wurden parallel mit Partikel-Enzym bzw. AMV-Enzym hergestellt und dabei die K^{+} -Konzentration, wie angegeben, variiert. Mg^{++} -Konzentration war 10 mM, pH war 8.3, Temperatur betrug 37°C. Die Inkubation lief für 5 Stunden. 100% Aktivität sind 365 000 cpm für AMV-Enzym, 4400 cpm für Partikel-Enzym. A = Partikel-Enzym B = AMV-Enzym

V. Inhibition und Stimulation der Enzymaktivität

1. Einfluß von Inhibitoren

a) Rifampicin

Das Rifampicinderivat 2,6-Dimethyl-4-benzyl-4-demethyl-rifampicin ist als Hemmstoff von Ting et al. (16) und Wu et al. (103) untersucht worden. Es wurde daher die Wirkung dieser Substanz auf das Partikel-Enzym gemessen, und mit der parallel gemessenen Hemmwirkung auf AMV Reverse Transkriptase verglichen. Da Wu et al. (104) gezeigt hatten, daß das Rifampicinderivat um die Templatebindungsstelle am Enzym konkuriert, wurde in allen Experimenten eine strikte Reihenfolge des Pipettierens eingehalten. Die Rifampicinlösung wurde zunächst in einer Verdünnungsreihe jeweils 1 : 1 verdünnt, und von den jeweiligen Verdünnungsstufen ein Aliquot in leere Reaktionsgefäße pipettiert. Dazu wurde ein Aliquot eines Gemisches gegeben, das Enzym, Puffer, Salze, BSA und ^3H -dGTP (entsprechend dem Standardansatz) enthielt, zugegeben und gemischt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des Template-Primer-Komplexes und durch Beginn der Inkubation bei 37°C gestartet. Da die Rifampicinstammlösung 5% DMSO enthielt, betrug die Konzentration an DMSO in den Ansätzen mit größter RIF-Konzentration 1%. Alle übrigen Ansätze, einschließlich der Kontrolle ohne Rifampicin, wurden ebenfalls auf diese DMSO-Konzentration gebracht, um den weiter unten gezeigten stimulierenden Einfluß von DMSO in allen Fällen gleich zu halten. Fig. 56 zeigt eine gleich verlaufende Hemmung von Partikel-Enzym und AMV-Enzym. Für eine 50%ige Inaktivierung ist in beiden Fällen eine Konzentration des Rifampicinderivates von 80 - 100 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ notwendig.

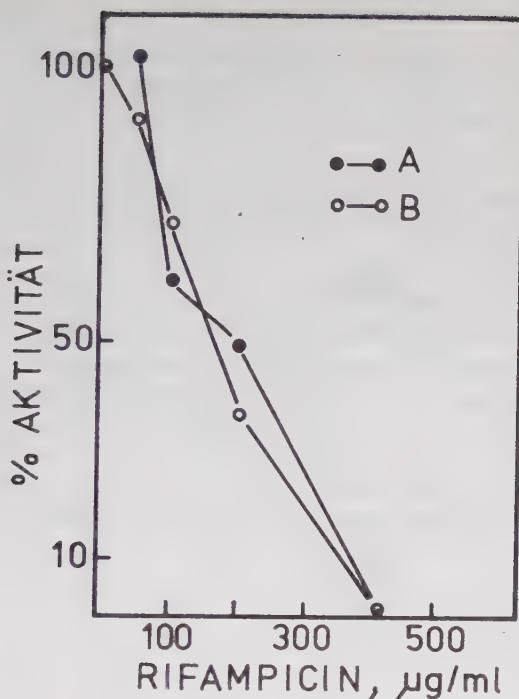


Fig. 56: Wirkung eines Rifampicinderivates auf Partikel-Enzym und AMV-Enzym.

Standardreaktionsansätze wurden mit Partikel-Enzym und AMV-Enzym, jeweils in Gegenwart von $p(C)(dG)_{12}$ und 3H -dGTP gemischt. Sie enthielten die angegebenen Konzentrationen des Hemmstoffes 2,6-Dimethyl-4-benzyl-4-demethyl-rifampicin. Die Ansätze wurden für 2 Stunden bei $37^{\circ}C$ inkubiert und der Einbau von radioaktivem Monomer in säureunlösliches Material bestimmt. Nach dem Abziehen eines Blindwertes von 200 cpm wurde die jeweilige Restaktivität, bezogen auf den Wert ohne Rifampicin als 100%, berechnet. 100% waren 10 469 cpm für Partikel-Enzym (A), 759 671 cpm für AMV-Enzym (B).

b) Actinomycin D

Die Hemmwirkung von Actinomycin D auf die DNA-abhängige DNA-Syntheseaktivität der viralen Reversen Transkriptasen wurde von McDonnell et al. (23) und Ruprecht et al. (24) gezeigt. Hier wurden sowohl die DNA- wie die RNA-abhängige Reaktion untersucht. Standardansätze mit Partikel-Enzym oder AMV-Enzym wurden mit steigenden Konzentrationen Actinomycin D versetzt und für 2 Stunden bei $37^{\circ}C$ inkubiert. Das Ergebnis in Fig. 57 zeigt eine deutliche Hemmung der DNA-abhängigen DNA-Synthese und eine schwache Hemmung der RNA-abhängigen DNA-Synthese. Die in Tab. 24 ermittelten Werte für 50%ige Inhibition ergeben aber nur einen geringfügigen Unterschied zwischen den Enzymen.

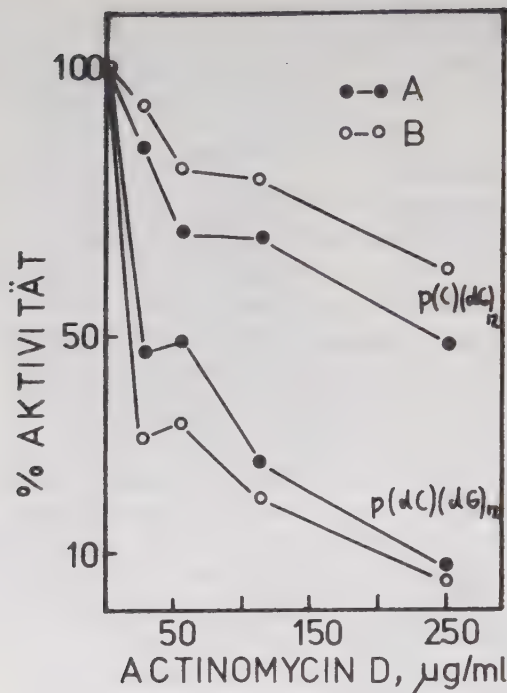


Fig. 57: Wirkung von Actinomycin D auf die RNA- bzw. DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität von Partikel- und AMV-Enzym.

Standardreaktionsansätze mit Partikel-Enzym (A), oder AMV-Enzym (B), wurden jeweils mit den Template-Primer-Komplexen p(C)(dG)₁₂ oder p(dC)(dG)₁₂ gemischt. Die Ansätze enthielten die angegebenen Konzentrationen Actinomycin D. Nach 120 Minuten Inkubation wurde der Einbau in säureunlösliches Material pro µl bestimmt. Ein Blindwert von 200 cpm wurde abgezogen. 100% Aktivität (Ansätze ohne Actinomycin D) waren:

A) Partikel-Enzym: 9269 cpm für p(C)(dG)₁₂, 6376 cpm für p(dC)(dG)₁₂;
B) AMV-Enzym: 54481 cpm für p(C)(dG)₁₂, 22594 cpm für p(dC)(dG)₁₂.

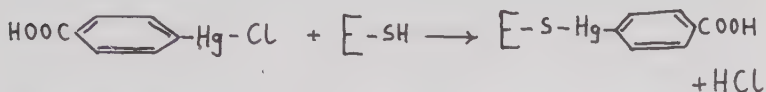
Tab. 24: Einfluß von Actinomycin D auf die RNA-abhängige und DNA-abhängige DNA Polymeraseaktivität von Partikelenzym bzw. AMV-Enzym.

Enzym aus	Template-Primer	Reaktionstyp	Konzentration von Act. D für 50% Inhibition µg/ml
Partikel	p(dC)(dG) ₁₂	DNA → DNA	50
	p(C)(dG) ₁₂	RNA → DNA	240
AMV	p(dC)(dG) ₁₂	DNA → DNA	30
	p(C)(dG) ₁₂	RNA → DNA	350*

Die Werte für die 50%ige Inhibition wurden aus Figur 57 entnommen. Der mit * gekennzeichnete Wert wurde durch Extrapolation erhalten.

c) Parachloromercuribenzoessäure (PCMB)

PCMB bindet an Sulfhydrylgruppen der Cysteinreste in Proteinen nach folgendem Schema:



Wenn sich eine oder mehrere Sulfhydrylgruppen im katalytischen Zentrum eines Enzyms befinden, kann deshalb das Enzym durch PCMB sehr effektiv inaktiviert werden. Wie Figur 58 zeigt, trifft dies sowohl für Partikel-Enzym als auch für AMV-Enzym zu.

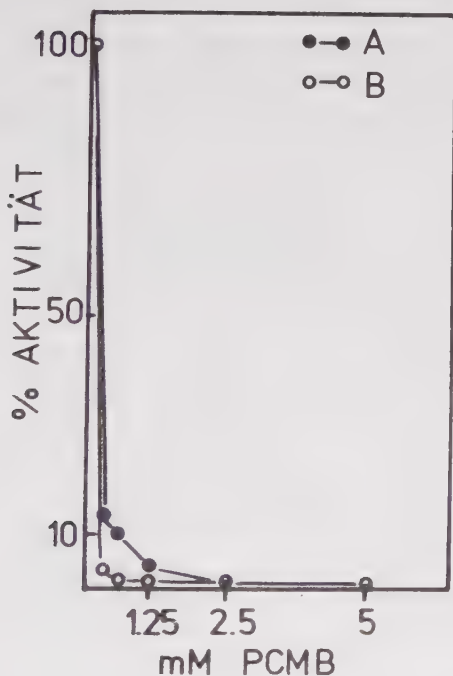


Fig. 58: Wirkung von Parachloromercuribenzoessäure auf Partikel-Enzym und AMV-Enzym.

Standardreaktionsansätze, mit p(C)(dG)_{12} und $^3\text{H-dGTP}$, wurden mit AMV-Enzym und Partikel-Enzym gemischt. Die Ansätze enthielten die angegebenen Konzentrationen an PCMB. Die Endkonzentration an DTE betrug dabei 0.2 mM. Inkubation erfolgt für 60 Minuten bei 37°C. Der Einbau von $^3\text{H-dGMP}$ in säureunlösliches Material wurde pro 100 μl bestimmt. Der abzuziehende Blindwert betrug 200 cpm. 100% Aktivität waren für Partikel-Enzym (A) 7096 cpm, für AMV-Enzym (B) 83 500 cpm.

2. Stimulierung der Reaktion durch Dimethylsulfoxid (DMSO)

Da Hemmstoffe von Reversen Transkriptasen, wie z.B. Rifampicinderivate nur unter DMSO-Zusatz in ausreichenden Konzentrationen gelöst werden können, wurde schließlich der Einfluß von DMSO auf Partikel-Enzym und AMV-Enzym gemessen. Standardpolymerisationsansätze wurden mit verschiedenen Konzentrationen DMSO versetzt und der Einbau gemessen. Das Ergebnis ist in Tab. 25 gezeigt. Man erkennt für beide Enzyme einen stimulierenden Effekt. Dieser Effekt wurde bei Inhibitionsexperimenten (z.B. Fig. 56) durch geeignete Kontrollen auskorrigiert. Im übrigen wurde der Effekt nicht zur Aktivitätssteigerung ausgenutzt, da über die Spezifität des Effektes nichts bekannt ist.

Tab. 25: Stimulierung von AMV-Enzym und Partikel-Enzym durch DMSO.

Enzym	% DMSO	Einbau/60 Min/100 µl (cpm)
Partikel	0	10 700
	0.25	12 300
	0.5	14 400
AMV	0	75 500
	0.25	85 482
	0.5	99 800

Standardreaktionsansätze $[p(C)(dG)_{12}]$ wurden auf die angegebenen Volumenprozent an DMSO gebracht und der Einbau pro 100 µl und 60 Minuten bestimmt.

E. DISKUSSION

Die Allantoisflüssigkeit bebrüteter, und nach biologischen und immunologischen Kriterien Leukosevirus-freier Hühner-eier enthält mindestens zwei strukturgebundene DNA-Polymeraseaktivitäten. Die DNA-Polymerase der langsamer sedimentierenden Struktur verwendet $p(C)(dG)_{12}$, $p(dC)(dG)_{12}$, $p(A)-(dT)_{12}$ und Globin mRNA (+ dT_{12}) als Template-Primer, d. h. sie zeigt Eigenschaften einer Reversen Transkriptase. Sie wurde daher eingehend untersucht. Die Struktur, in die das Enzym eingeschlossen ist, wird vorläufig als "Partikel" bezeichnet.

Durch Kombination verschiedener Zentrifugationsschritte können die Partikel angereichert, und die schneller sedimentierende DNA-Polymeraseaktivität (vermutlich handelt es sich dabei um strukturgebundene DNA-Polymerase α oder β) abgetrennt werden. Durch eine Reihe einfacher Experimente wird sichergestellt, daß der gemessene Einbau radioaktiv markierter Deoxynukleotide tatsächlich durch eine Template- und Primer-abhängige DNA-Polymerisationsreaktion zustandekommt. Die Reaktion kann nur ablaufen, wenn die Partikel mit nicht-ionischem Detergenz behandelt werden. Man kann daher annehmen, daß es sich bei den Partikeln um Strukturen handelt, die von einer Lipoproteidmembran umhüllt sind.

Das Zusammentreffen der Kriterien a) membranumhüllte sedimentierbare Struktur, b) Reverse Transkriptase vorhanden, c) Schwimmdichte in Rohrzucker 1.15 g/cm^3 , führt leicht zur Diagnose "RNA-Tumovirus". Diese Diagnose ist in diesem Fall nicht zutreffend, wie im weiteren Verlauf der Diskussion gezeigt wird.

Der Vergleich der Partikel mit den bekannten Hühner-RNA-Tumoviren, d. h. den Retikuloendothelioseviren (REV) und den Hühner-Leukose-Sarkomviren (ALV/ASV) zeigt keine Verwandtschaftsbeziehungen. Die Partikel führen beim Test auf Hühnerfibroblasten zu keinerlei erkennbaren biologischen Effekten. Insbesondere werden keine der für die ALV/ASV-

Gruppe typischen Eigenschaften wie Helferaktivität und Interferenzfähigkeit gefunden. Die Sedimentationskonstante der Partikel (480 S) unterscheidet sich deutlich von jener der Viren der ALV/ASV-Gruppe (680 S). Bei der Analyse der Proteinzusammensetzung der Polyacrylamidgelen zeigen sich eindeutige Unterschiede zwischen Partikeln einerseits und Hühnerleukoseviren und REV andererseits. Es finden sich Hauptstrukturkomponenten der Partikel mit den Molekulargewichten 45 000, 35 800 und 17 600 Dalton. Hingegen sind weder die Hauptstrukturkomponenten der Hühnerleukoseviren noch der Retikuloendothelioseviren in den gereinigten Partikeln nachzuweisen. Interessanterweise findet sich umgekehrt in einigen Analysen der Leukosevirusproteine bzw. der REV-Proteine Material in der Position, die der 45 000-Dalton-Hauptkomponente der Partikel entspricht. Dies kann sowohl durch Anwesenheit von Partikeln in der Viruspräparation, als auch durch die Annahme erklärt werden, daß die Viren geringe Mengen des gleichen Wirtszellmaterials, aus dem die Partikel bestehen, beinhalten. Als triviale Erklärung wäre möglich, daß es sich um verschiedene Proteine, mit zufällig gleicher elektrophoretischer Mobilität handelt. Weitere Argumente gegen eine Virusnatur der Partikel sind die in vorläufigen elektronenmikroskopischen Untersuchungen festgestellte Heterogenität der Größe der Partikel (gegenüber einer unter gleichen Bedingungen festzustellenden Homogenität von AMV), das Fehlen einer endogenen RNA-abhängigen DNA-Polymeraseaktivität, und das Auftreten der Partikel in der Allantoisflüssigkeit von Eiern, deren Embryonen vom Genotyp $gs^- chf^-$ sind, d. h. auch teilweise Expression des endogenen Virusgenoms nicht gestatten würden.

Nachdem durch diese Befunde ausgeschlossen werden kann, daß es sich bei den Partikeln um Mitglieder einer der beiden Gruppen von Hühner-RNA-Tumerviren (REV und ALV/ASV) handelt, stellen sich zwei grundlegende Fragen:

1) Handelt es sich bei dem Partikelenzym um eine echte Reverse Transkriptase, d.h. um ein Enzym, das auch nach Reinigung in der Lage ist, in vitro und abhängig von zugesetzter natürlicher heterogener RNA eine exakte DNA-Kopie zu synthetisieren?

2) Handelt es sich bei dem Partikelenzym um das Genprodukt des Polymerasegens einer der beiden Gruppen der bekannten Hühner-RNA-Tumoviren, d.h., wird das Enzym in der Folge einer Infektion durch exogene Retikuloendothelioseviren oder Hühner-Leukose/Sarkomviren, bzw. durch die Expression des Polymerasegens des endogenen Hühner-leukosevirus synthetisiert?

Um die Antwort auf die erste Frage zu finden, wurde das Enzym durch Affinitätschromatographie aus angereicherten Partikeln isoliert. Der Anreicherungsfaktor bis zur Stufe der gereinigten Partikel betrug um 5000. Nach der Affinitätschromatographie war die Proteinkonzentration der Enzymfraktionen zu gering, um Protein messen zu können, während im Durchlauf alles meßbare Protein zu finden war. Unter der Annahme, daß der Anreicherungsfaktor wenigstens 10 war (d.h., daß 90% des Proteins abgetrennt wurde, während die gesamte Aktivität erhalten blieb) kann ein Gesamtanreicherungsfaktor für das Enzym von mindestens 50 000 angegeben werden.

Das gereinigte Enzym synthetisiert in Anwesenheit von Template, Primer und Deoxynukleosidtriphosphaten DNA. Die Reaktion verläuft linear in Bezug auf die Zeit und die Enzymkonzentration. Dabei werden Magnesiumionen, ein pH um 8 und eine Temperatur zwischen 35 und 40°C benötigt.

Das Partikelenzym zeigt das gleiche Muster der Präferenzen für Homopolymerkomplexe wie die viralen reversen Transkriptasen, nämlich $p(C)(dG)_{12} > p(dC)(dG)_{12} > p(A)(dT)_{12} >> p(dA)(dT)_{12}$. Template oder Primer allein geben keine Aktivität. Dadurch ist das Partikelenzym von den zellulären DNA-Polymerasen α , β und γ , sowie von terminaler Deoxynukleotidyltransferase

eindeutig abgegrenzt. Aus der Verwendung von Ribonukleotidhomopolymeren und Deoxynukleotidhomopolymeren als Template läßt sich ersehen, daß das Enzym sowohl RNA- als auch DNA-abhängige DNA-Polymeraseaktivität besitzt. Der endgültige Beweis, daß es sich bei dem Partikelenzym um eine echte Reverse Transkriptase handelt, wird durch das Studium der durch das Enzym katalysierten reversen Transkription heteropolymerer RNA erbracht. Der heteropolymere Anteil von Globin mRNA dient bei gleichzeitiger Anwesenheit von $(dT)_{12}$ als Matrize für heteropolymere DNA-Synthese. Durch Verwendung von 3H -dGTP, und unmarkiertem dATP, dCTP und dTTP ist sichergestellt, daß die reverse Transkription des heteropolymeren Anteils, und nicht des Polyadenylsäureanteils gemessen wird. Bei Weglassen der mRNA oder Zugabe von RNase, erfolgt keine Reaktion, was zeigt, daß die DNA-Synthese von der Globin-mRNA gesteuert wird. Weglassen eines der unmarkierten Deoxynukleosidtriphosphate führt ebenfalls zu Abbruch der Reaktion, woraus geschlossen werden kann, daß tatsächlich heteropolymere Synthese abläuft. Das Primärprodukt der Globin-mRNA-abhängigen DNA-Synthese ist ein RNA-DNA-Hybridmolekül. Durch Alkaliverdau kann die ursprüngliche Template zerstört und die DNA in freier Form erhalten werden. Diese DNA sedimentiert mit 5 S, ist durch Alkalistabilität, Sensitivität gegen DNase und Schwimmdichte in Cs_2SO_4 von 1.45 g/cm^3 als DNA ausgewiesen. Die fast vollständige Sensitivität gegen S 1-Nuklease zeigt, daß diese DNA einzelsträngig ist. Das DNA-Produkt kann an ursprüngliche Template-RNA fast quantitativ rückhybridisiert werden. Das Rückhybrid ist bei Raumtemperatur S 1-Nuklease-resistent. Es zeigt einen Schmelzpunkt von $85^\circ C$ (in 1 X SSC). Dieser Schmelzpunkt wird auch gefunden, wenn ein von AMV-Enzym synthetisiertes Hybrid aus Globin-mRNA und cDNA zum Vergleich untersucht wird. Der Schmelzpunkt von $p(A) \cdot p(dT)$ beträgt unter gleichen Bedingungen $67^\circ C$. Die Ergebnisse der durchgeführten Experimente lassen sich nur dadurch erklären, daß das Partikelenzym eine exakte, basenkomplementäre DNA-Kopie von mindestens einem größeren Bereich

der heteropolymeren RNA synthetisiert hat. (Siehe auch die Übersicht auf S. 105.) Das Partikelenzym ist deshalb als echte Reverse Transkriptase zu betrachten.

Die zweite Frage wurde für REV und ALV/ASV jeweils getrennt untersucht. Das gereinigte Enzym unterscheidet sich von der Polymerase der Retikuloendothelioseviren eindeutig im Sedimentationsverhalten und in der Präferenz für divalente Kationen. Da die Retikuloendothelioseviren nur exogen, und nicht als endogene Viren auftreten (64,67), setzt das Auftreten des Enzyms REV-Infektion voraus, welche in der Regel zu deutlichen cytopathischen Effekten führt. Das ubiquitäre Auftreten des Partikelenzyms ist mit dieser Annahme nicht vereinbar. Dadurch wird zusätzlich zu den biochemischen Daten ein biologisches Argument dagegen geliefert, daß das Partikelenzym vom REV-Polymerasegen codiert sein könnte.

Die Abgrenzung des Partikelenzyms von der Reversen Transkriptase der ALV/ASV wurde vor allem durch die Anwendung des sehr sensitiven IgG-Neutralisationstestes möglich. Im Vergleich zum homologen Enzym wird für eine 50%ige Hemmung des Partikelenzym durch Anti-AMV-Polymerase-IgG eine 40 bis 250-fach höhere Konzentration an IgG benötigt. Das zeigt zunächst, daß Partikelenzym und die Reverse Transkriptase der ALV/ASV sicher nicht identisch sind; wie aus Tabelle 21 hervorgeht, werden die Polymerasen aller Mitglieder dieser Virusgruppe, einschließlich der endogenen Viren, durch Anti-AMV-Polymerase-IgG gleichartig gehemmt. Der Vergleich der Daten aus Tabelle 21 mit den hier gebrachten Daten zeigt außerdem, daß die beobachtete Kreuzreaktion wesentlich geringer ist, als für entfernt verwandte Viren beschrieben. Eine geringe Anzahl gemeinsamer Determinanten kann nicht vollkommen ausgeschlossen werden, ist jedoch wegen der beobachteten unterschiedlichen Hemmwirkung verschiedener IgG-Präparationen auf Partikelenzym, bei gleichstarker Hemmwirkung auf AMV-Enzym, nicht wahrscheinlich.

Weitere biochemische Untersuchungen ergeben, daß die beiden Enzyme in ihrer thermischen Inaktivierbarkeit, in den K_M -Werten und ihrer Charakteristik der Substratabhängigkeit (dGTP), und in ihrer Empfindlichkeit gegenüber nicht-ionischen Detergenzien deutliche Unterschiede zeigen. Zusammen mit den immunologischen Daten lassen sich diese Ergebnisse am ehesten so interpretieren, daß es sich bei Partikelenzym und der Reversen Transkriptase der ALV/ASV-Gruppe um verschiedene Proteine handelt; d.h., das Partikelenzym ist nicht das Genprodukt des Polymerasegens der ALV/ASV. Da die Identität des Polymerasegens der exogenen und der endogenen ALV/ASV bekannt ist (79), ist somit auch ausgeschlossen, daß das Partikelenzym ein Produkt der Expression des endogenen Polymerasegens ist. Damit ist erstmalig aus einem virusfreien und untransformierten System eine echte Reverse Transkriptase isoliert und charakterisiert worden.

Die Herkunft des Enzyms aus einem Virus einer bisher unbekannten Gruppe kann natürlich aus prinzipiellen Gründen nicht ausgeschlossen werden. Das ubiquitäre Auftreten der Partikel in allen getesteten Herden und in jedem einzelnen Ei, sowie die fehlende biologische Aktivität sprechen jedoch gegen diese Annahme, zumindest aber gegen ein Virus im klassischen Sinn. Wesentlichen Fortschritt in dieser Frage kann man sich aus Experimenten erwarten, die klären sollen, ob die Partikel Nukleinsäuren enthalten. Wegen der geringen Materialmengen sind dazu noch einige methodische Hindernisse zu überwinden.

Akzeptiert man die Annahme, daß das in der Allantoisflüssigkeit gefundene Enzym in einigen oder allen Zellen des Embryos synthetisiert wird, so kann aufgrund dieser Arbeit das untersuchte System in wesentlichen Punkten ergänzt werden:

Es gibt zusätzlich zu dem Polymerasegen des endogenen Hühnerleukosevirus ein zweites Gen, das für eine Reverse Transkriptase codiert. Dieses Gen wird, im Gegensatz zu ersterem,

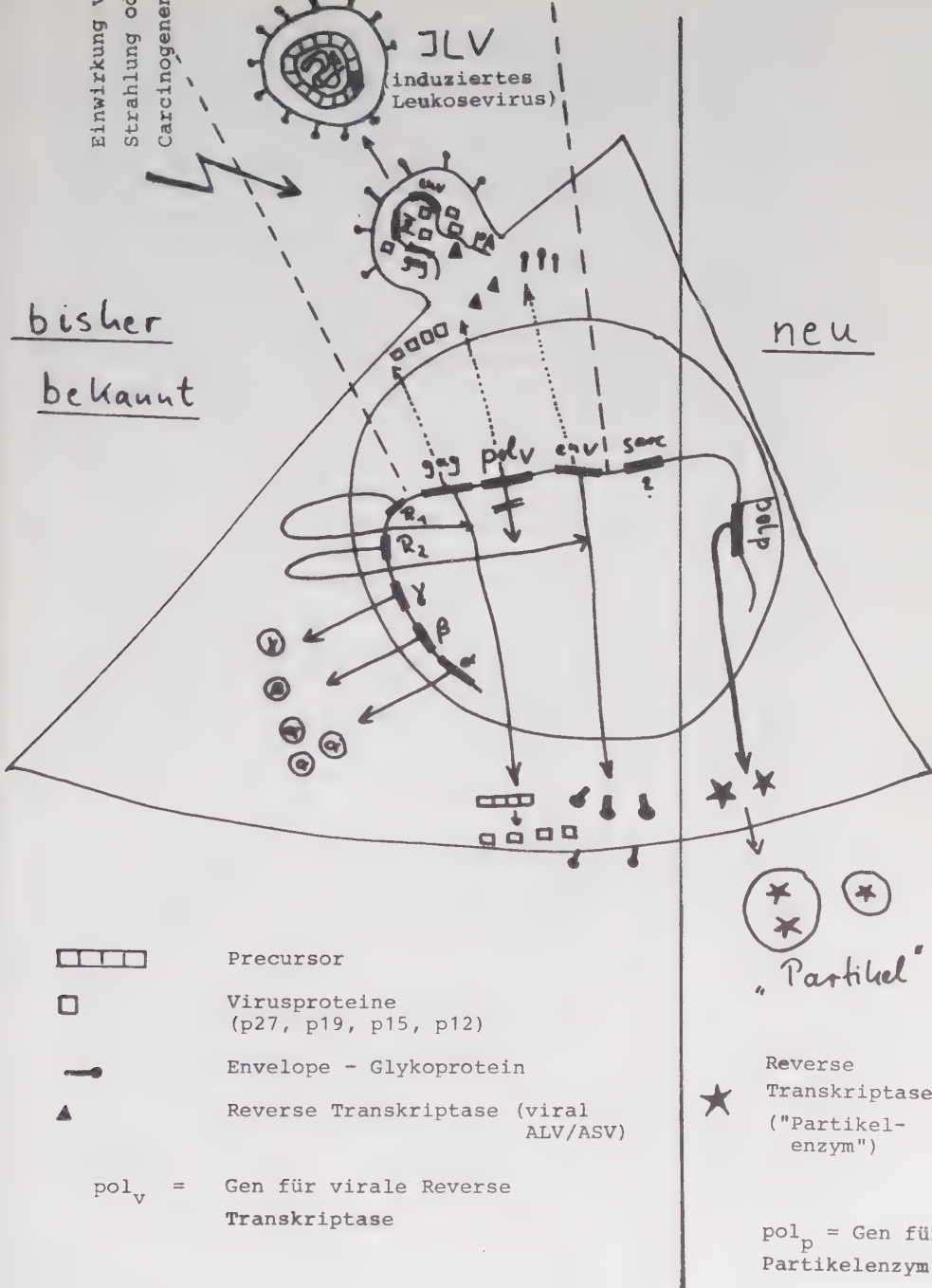
Einwirkung von
Strahlung oder
Carcinogenen



JLV
(induziertes
Leukosevirus)

bisher
bekannt

neu



Precursor



Virusproteine
(p27, p19, p15, p12)



Envelope - Glykoprotein



Reverse Transkriptase (viral
ALV/ASV)

pol_v = Gen für virale Reverse
Transkriptase

"Partikel"



Reverse
Transkriptase
("Partikel-
enzym")

pol_p = Gen für
Partikelenzym

Erklärung zur Übersichtszeichnung:

Der DNA-Faden im Zellkern steht stellvertretend für die Gesamt-DNA der Zelle. Die Pfeile bedeuten "Expression", d.h. sie stehen für Transkription und Translation.

Im linken Teil der Zeichnung sind die bereits in der Einleitung dargestellten Kenntnisse über die uninfiizierte Hühnerzelle in den wesentlichen Punkten zusammengefaßt: Das Genom enthält Gene für mindestens drei DNA-Polymerasen, nämlich α , β und γ . Diese sind exprimiert, die Produkte lassen sich nachweisen. Weiterhin befinden sich in der DNA Gene des endogenen Leukosevirus (gag, pol, env) und wahrscheinlich das Gen "sarc". Die Expression der Gene gag und env wird reguliert (hypothetische Regulationsgene R_1 und R_2), dabei sind alternative Zustände möglich, d.h. Zellen mit oder ohne Expression dieser Gene. Das Gen "pol", das für die virusspezifische Reverse Transkriptase codiert, wird in uninfiizierten Zellen nicht exprimiert. Die Expression der Gene gag und env führt nicht zur Produktion von Viren oder zur Transformation der Zelle. Nach Einwirkung von Strahlung oder Carcinogenen können endogene Viren induziert werden (ILV = Induzierte Leukose-Viren). In diesem Fall werden alle drei Gene (gag, pol, env) exprimiert. Außerdem entstehen Transkripte, die in einem RNA-Stück mindestens diese drei Gene besitzen. Diese RNA wird in mehreren Kopien, zusammen mit spezifischen t-RNAs in Viren eingebaut, die die Zelle durch "Budding" entlassen.

Im rechten Teil der Zeichnung ist das wesentliche Ergebnis dieser Arbeit eingetragen: Das Genom besitzt ein zweites Gen für eine Reverse Transkriptase (polp). Dieses Gen wird in der normalen embryonalen Zelle exprimiert. Es ist verschieden von dem Polymerasegen pol_v der endogenen Leukoseviren und den Genen der in der Zeichnung nicht berücksichtigten exogenen Viren. Das Enzym erfüllt auch bei Anlegen strenger Maßstäbe alle Bedingungen, um als echte Reverse Transkriptase bezeichnet werden zu können. Diese Reverse Transkriptase findet sich in Partikeln wieder, die von den Zellen aktiv oder passiv in die Allantoisflüssigkeit entlassen werden. Die Partikel zeigen keine Verwandtschaft zu den bekannten RNA-Tumoviren.

zumindest in der normalen embryonalen Zelle exprimiert. Das Genprodukt, die Partikelpolymerase, ist regelmäßig nachweisbar. Die Schemazeichnung (S. 141) faßt das bisherige Wissen um das System, und die durch diese Arbeit erbrachten Ergänzungen, zusammen.

Wie aus der Zeichnung hervorgeht, müssen auf Grund der Ergebnisse dieser Arbeit eingebürgerte Vorstellungen über das System Zelle - RNA - Tumovirus revidiert werden. Ein "virusfrei" befundenes System kann nicht länger als zwangsläufig frei von Reverser Transkriptase gesehen werden. In Umkehrung

dieser Aussage gilt, daß der Nachweis von Reverser Transkriptase nicht so eindeutig wie bisher angenommen zum Nachweis von Tumurviren und zur Früherkennung maligner Entwicklungen zu verwenden ist. Es muß vielmehr zunächst angenommen werden, daß sie auch zellulären Ursprungs sein kann.

Die Existenz einer zellulären Reversen Transkriptase ist bereits von Temin in der Protovirustheorie (62) postuliert worden. Reverse Transkription entgegen der üblichen Richtung des Transfers genetischer Information von DNA zu RNA und Protein ("Zentrales Dogma") soll demnach keine Besonderheit der Tumurviren, sondern eine allgemeine biologische Gesetzmäßigkeit darstellen. Sollte dies gelten, könnte Reverse Transkription zu einem Austausch genetischer Information zwischen Zellen und zu einem Umbau der genetischen Information im Zellgenom führen. So gesehen, könnte Reverse Transkription eine wichtige physiologische Rolle bei Genamplifikation und Differenzierung sowie bei der Steuerung der Immunantwort spielen. Die maligne Entartung einer Zelle durch den gleichen Mechanismus wäre als "ein Abkommen vom rechten Weg" oder als Mißbrauch durch Viren zu betrachten. Bisherige Versuche zur Abstützung der Hypothese, eine zelluläre Reverse Transkriptase zu isolieren, sind trotz Nachweis einer PNA-abhängigen DNA-Polymerase in Zellextrakten aus Hühnerembryonen fehlgeschlagen (60,61).

Das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Enzym kommt als Kandidat für das von Temin geforderte Enzym in Betracht. Vor allem das ubiquitäre Auftreten des Enzyms macht diese Annahme akzeptabel, da es von der Theorie zwangsläufig gefordert wird. Die Verschiedenheit des gefundenen Enzyms von den Enzymen der bekannten endogenen RNA-Tumurviren war von der Theorie nicht zwangsläufig gefordert, da man auch spekulieren konnte, daß ein virales Enzym, losgelöst von Replikationsvorgängen, die postulierte physiologische reverse Transkription durchführen könnte. Vielleicht kann die Verschiedenheit der Enzyme in diesem System aber dazu verhelfen, physiologische reverse Transkription von viraler Replikation klar zu unterscheiden.

Bei der von Mayer et al. (58) beschriebenen Reversen Transkriptase aus normalen Primatenplacenten handelt es sich zwar um die Polymerase eines endogenen Virus, doch spricht nichts dagegen, daß es sich auch dort um ein Enzym handelt, das möglicherweise ebenfalls die in der Protovirustheorie postulierten Funktionen erfüllt. So könnte man spekulieren, daß sowohl nicht-virale Enzyme (wie das Partikelenzym) wie auch Enzyme endogener Viren, "physiologische" reverse Transkription durchführen können. Möglicherweise erfaßt man mit dieser Betrachtungsweise die "Nahtstelle" der Entwicklung von (transportablen) nicht-viralen Reversen Transkriptasen und Reversen Transkriptasen, die zusammen mit entsprechender Nukleinsäure eine replikationsfähige Einheit, ein Virus, darstellen. Auch diese Gedankengänge sind im wesentlichen in der Protovirustheorie ausgedrückt, neu ist jedoch der experimentelle Zugang zu diesen Problemen durch die vorliegende Arbeit.

In der Protovirustheorie wird unter anderem diskutiert, daß die physiologische reverse Transkription unter Umständen (Transkriptionsfehler etc.) zur malignen Entwicklung führen kann. Aus den hier vorliegenden Daten ergibt sich allerdings kein Hinweis auf diesen Effekt, denn einige der Herden, deren Eier untersucht wurden, zeichnen sich ja gerade durch geringe Häufigkeit spontaner Leukämien aus. Sehr wahrscheinlich gibt es eine Reihe bisher unbekannter Faktoren, die der malignen Entartung eines Gewebes entgegenwirken.

Es stellt sich natürlich die Frage, warum das Enzym strukturgebunden und außerhalb der Zelle, in der Allantoisflüssigkeit, angetroffen wird. Aufgrund der bisherigen Befunde kann nicht entschieden werden, ob die Partikel aktiv oder passiv ausgeschieden werden. Das Auffinden einer DNA-Polymerase in extrazellulären, nicht-viralen Partikeln ist allerdings nicht auf das hier untersuchte System beschränkt. Margalith et al. (35) haben nämlich gezeigt, daß in den Überständen von Zellkulturen menschlicher Fibroblasten Partikel zu finden sind, die eine Schwimmdichte um 1.16 g/cm^3 und endogene RNase-sensitive

DNA-Polymeraseaktivität besitzen. Diese DNA-Polymeraseaktivität ist teilweise hemmbar durch Actinomycin D. Da diese Kriterien auch für RNA-Tumroviren zutreffen, könnte man auch dort zur Fehldiagnose "RNA-Tumroviren" gelangen. Nach weiterer Charakterisierung der Partikel zeigte sich nämlich, daß sie mitochondriale DNA-Polymerase enthalten. Die RNase-Sensitivität der DNA-Polymerasereaktion wird dabei durch einen RNA-Primer verursacht, die Reaktion selbst ist DNA-abhängig. Diese Daten und die Daten über das Partikel aus Hühnereiern, in der vorliegenden Arbeit, zeigen, daß die bisher zur Charakterisierung eines RNA-Tumrovirus oft als ausreichend empfundenen Kriterien unzureichend sind, und zu "virologischen Täuschungen" führen können.

Neuerdings wird eine einfache Erklärung der pathogenetisch wichtigen Persistenz von Infektionen mit Viren der Myxo- und Paramyxogruppe diskutiert. Auf Grund neuer experimenteller Befunde (106,107) wird angenommen, daß die RNA dieser Viren in einem "Replikationsmodus 2. Wahl" (107) in DNA umgesetzt und so konserviert wird. Da beide Virusgruppen keine eigene Reverse Transkriptase besitzen, ist ein solcher Mechanismus nur denkbar bei gleichzeitigem Vorkommen exogener RNA-Tumroviren, oder der Expression des Polymerasegens des Genoms eines endogenen Virus oder der Wirkung eines dem Partikelenzym analogen Enzyms.

Zum Abschluß sei eine praktische Bedeutung dieser Arbeit erwähnt: Da gezeigt wurde, daß die Reverse Transkriptase-tragenden Partikel ubiquitär in der Allantoisflüssigkeit bebrüteter Hühnereier vorkommen, folgt natürlich, daß alle Viren, die in Hühnereiern vermehrt werden, durch Partikel verunreinigt sind. Bei enzymologischen Untersuchungen kann dies unter Umständen zu falschen Aussagen führen, indem Aktivitäten des Partikels fälschlicherweise den gezüchteten Viren zugeordnet werden.

Da Viren für Impfzwecke (z.B. Influenza) meistens in Hühnereiern gezüchtet werden, kann angenommen werden, daß auch die gewonnenen Impfstoffe Partikel beinhalten. Wie eigene Untersuchungen ergaben, ist die Partikelkonzentration in der Allantoisflüssigkeit nicht verändert, wenn Viren in dem Ei vermehrt wurden. Trotz der unterschiedlichen Dichte von Myxoviren und Partikeln enthalten auch relativ gutgereinigte Influenzapräparationen noch deutlich meßbare Partikelmengen. Falls es sich, wie durch diese Arbeit wahrscheinlich gemacht wurde, bei den Partikeln nicht um Viren handelte, sollte die Verunreinigung der Impfstoffe mit Partikeln ohne Bedeutung sein. Handelt es sich jedoch wider Erwarten um eine neue Gruppe von RNA-Tumroviren, dann sollten aus Eiern gewonnene Impfstoffe zumindest nicht als Lebendvaccine verwendet werden.

Aus diesem Grund, und zur weiteren Aufklärung von Regulationsvorgängen, sollten die Partikel in Hinblick auf ihre mögliche Funktion weiter untersucht werden. Falls es sich bei der "Partikel-Reverse Transkriptase" tatsächlich um das in der Protovirustheorie postulierte Enzym handelt, sollten sich entsprechende Aktivitäten auch in anderen Systemen nachweisen lassen.

F. LITERATUR

- 1) Crick, F. (1970) "Central dogma of molecular biology". Nature 227, 561-563.
- 2) Fairman, M. (1959) "Effects of 4-fluorouracil in Rous Sarcoma Virus infection in vitro". J. Gen. Microbiol. 20, ii-iii.
- 3) Bather, R. (1963) "Influence of 5-fluorodeoxyuridine and Actinomycin D on the production of Rous Sarcoma Virus in vitro". Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 4, 4-7.
- 4) Temin, H.M. (1963) "The effects of Actinomycin D on growth of Rous Sarcoma Virus in vitro". Virology 20, 577-582.
- 5) Temin, H.M. (1964 a) "The participation of DNA in Rous Sarcoma Virus production". Virology 23, 486-494.
- 6) Vigier, P. & Golde, A. (1964) "Effects of Actinomycin D and of Mitomycin C on the development of Rous Sarcoma Virus". Virology 23, 511-519.
- 7) Bader, J.P. (1964) "The Role of Deoxyribonucleic Acid in the synthesis of Rous Sarcoma Virus". Virology 22, 462-468.
- 8) Bader, J.P. (1966) "Metabolic requirements for infection by Rous Sarcoma Virus. I. The transient requirement for DNA synthesis". Virology 29, 444-451.
- 9) Temin, H.M. (1964 b) "Nature of the provirus of Rous Sarcoma". National Cancer Institute Monograph 17, Avian Tumor Viruses, pp 557-570.
- 10) Baltimore, D. (1970) "RNA-dependent DNA-polymerase in virions of RNA Tumour Viruses". Nature 226, 1209-1211.
- 11) Temin, H.M. & Mizutani, S. (1970) "RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous Sarcoma Virus". Nature 226, 1211-1213.

- 12) Temin, H.M. & Baltimore, D. (1972) "RNA-directed DNA synthesis and RNA Tumour Viruses". *Advances in Virus Research* 17, 129-186.
- 13) Green, M. & Gerard, G.F. (1974) "RNA-directed DNA polymerase. Properties and functions in oncogenic RNA viruses and cells". *Progress in Nucleic Acids Research and molecular Biology* 14, 186-336.
- 14) Temin, H.M. (1974) "The cellular and molecular biology of RNA Tumor Viruses; especially Avian Leukosis-Sarcoma Viruses, and their relatives". *Advances in Cancer Research* 19, 47-104.
- 15) Bader, J.P. (1975) "Reproduction of RNA Tumour Viruses". in *Comprehensive Virology*, Vol. 4, chapter 4, pp 253-332. Plenum Press, New York.
- 16) Ting, C. R., Yang, S.S. & Gallo, R.C. (1972) "Reverse transcriptase, RNA Tumour Virus transformation, and derivatives of Rifamycin SV". *Nature New Biology* 236, 163-166.
- 17) Hanafusa, H., Baltimore, D., Smoler, D., Watson, K.F., Yaniv, A., Spiegelman, S. (1972) "Absence of polymerase protein in virions of alpha-type Rous Sarcoma Virus". *Science* 177, 1188-1191.
- 18) Peebles, P.T., Haapala, D.K. & Gazdar, A.F. (1972) "Deficiency of viral Ribonucleic Acid-dependent Deoxy-ribonucleic Acid polymerase in noninfectious virus-like particles released from Murine Sarcoma Virus-transformed Hamster cells". *J. Vir.* 9, 488-493.
- 19) Mason, W.S., Friis, R.R., Lineal, M. & Vogt, P.K. (1974) "Determination of the defective function in two mutants of Rous Sarcoma Virus". *Virology* 61, 559-574.

- 20) Verma, I.M., Mason, W.S., Drost, S.D. & Baltimore, D. (1974) "DNA polymerase activity from two temperature-sensitive mutants of Rous Sarcoma Virus is thermolabile". *Nature* 251, 27-31.
- 21) Temin, H.M. & Mizutani, S. (1974) "RNA Tumour Virus DNA polymerases". in: *The Enzymes*, Vol. X; ed. by Boyer; Academic Press, N.Y., pp 211-235.
- 22) Smoler, D., Molineux, I. & Baltimore, D. (1971) "Direction of polymerization by the Avian Myeloblastosis Virus DNA polymerase". *J. Biol. Chem.* 246, 7697-7700.
- 23) McDonnell, J.P., Garapin, A.C., Levinson, W.E., Quintrell, W., Fanshier, L. & Bishop, J.M. (1970) "DNA polymerases of Rous Sarcoma Virus: Delineation of two reactions with Actinomycin". *Nature* 228, 433-435.
- 24) Ruprecht, R.M., Goodman, W.C. & Spiegelman, S. (1973) "Conditions for the selective synthesis of DNA complementary to template RNA". *BBA* 294, 192-203.
- 25) Spiegelman, S., Burny, A., Das, M.R., Keydar, J., Schlom, J., Travnicek, M. & Watson, K.F. (1970) "Synthetic DNA-RNA hybrids and RNA-RNA duplexes as templates for the polymerases of the oncogenic RNA Viruses". *Nature* 228, 430-432.
- 26) Baltimore, D. & Smoler, D. (1971) "Primer requirement and template specificity of the DNA polymerase of RNA Tumour Viruses". *PNAS* 68, 1507-1511.
- 27) Goodman, N.C. & Spiegelman, S. (1971) "Distinguishing Reverse Transcriptase of an RNA Tumour Virus from other known DNA polymerases". *PNAS* 68, 2203-2206.
- 28) Robert, M.S., Smith, R.G. & Gallo, R.C. (1972) "Viral and cellular DNA polymerase: comparison of activities with synthetic and natural RNA templates". *Science* 174, 798-800.

- 29) Todaro, G.J. & Gallo, R.C. (1973) "Immunological relationship of DNA polymerase from human acute leukemia cells and primate and mouse leukemia virus reverse transcriptase". Nature 244, 206-209.
- 30) Gallagher, R.E., Todaro, G.J., Smith, R.G., Livingstone, D.M. & Gallo, R.C. (1974) "Relationship between RNA-directed DNA polymerase (reverse transcriptase) from human acute leukemic blood cells and primate type-C virus". PNAS 71, 1309-1313.
- 31) Weissbach, A. (1975) "Vertebrate DNA polymerases". Cell 5, 101-108.
- 32) Smith, R.G. & Gallo, R.C. (1972) "DNA-dependent DNA polymerases I and II from normal human-blood lymphocytes". PNAS 69, 2879-2884.
- 33) Bobrow, S.N., Smith, R.G., Reitz, M.S. & Gallo, R.C. (1972) "Stimulated human lymphocytes contain a ribonuclease-sensitive DNA polymerase distinct from viral RNA-directed DNA polymerase". PNAS 69, 3228-3232.
- 34) Reitz, M.S., Smith, R.G., Roseberry, E.A. & Gallo, R.C. (1974) "DNA-directed and RNA-primed synthesis in microsomal and mitochondrial fractions of normal human lymphocytes". BBRC 57, 934-948.
- 35) Margalith, M., Gerard, G.F. & Green, M. (1976) "Studies on DNA polymerase activity contained in particles released from human embryo cell monolayers". BBA 425, 305-315.
- 36) Weissbach, A., Bolden, A., Muller, R., Hanafusa, H. & Hanafusa, T. (1972) "Deoxyribonucleic Acid polymerase activities in normal and leukovirus-infected Chicken Embryo cells". J. Vir. 10, 321-327.

- 37) Bolden, A., Fry, M., Muller, R., Citarella, R. & Weissbach, A. (1972) "The presence of polyriboadenylic acid-dependent DNA polymerase in eukaryotic cells". *ABB* 153, 26-33.
- 38) Brun, G., Rougeon, F., Lamber, M. & Chapeville, F. (1974) "Purification and properties of DNA polymerases from chick embryo". *Eur. J. Biochem.* 41, 241-251.
- 39) Rougeon, F., Brun, G. & Chapeville, F. (1974) "Comparative studies on template-initiator requirements of the chick-embryo DNA polymerase I and the Avian Myeloblastosis Virus DNA polymerase". *Eur. J. Biochem.* 41, 253-261.
- 40) Scolnick, E.M., Parks, W.P., Todaro, G.J. & Aaronson, S.A. (1972) "Immunological characterization of primate C-type virus reverse transcriptase". *Nature New Biology* 235, 35-40.
- 41) Livingston, D.M., Serxner, L.E., Howk, D.J., Hudson, J. & Todaro, G.J. (1974) "Characterization of a new murine cellular DNA polymerase". *PNAS* 71, 57-62.
- 42) Sarngadharan, M.G., Sarin, P.S., Reitz, M.S. & Gallo, R.C. (1972) "Reverse transcriptase activity of human acute leukaemic cells: purification of the enzyme, response to AMV 70 S RNA, and characterization of the DNA product". *Nature New Biology* 240, 67-72.
- 43) Yang, S.S. & Wivel, N.A. (1974) "Characterization of an endogenous RNA-dependent DNA polymerase associated with murine intracisternal A-particles". *J. Vir.* 13, 712-720.
- 44) Robertson, D.L., Baenziger, N.L., Dobberty, D.C. & Thach, R.E. (1975) "Characterization of DNA polymerase and RNA associated with A-type particles from murine myeloma cells". *J. Vir.* 15, 407-415.
- 45) Schlom, J., Harter, D.H., Burny, A. & Spiegelman, S. (1970) "DNA polymerase activities in virions of Visna Virus, a causative agent of a "slow" neurological disease". *PNAS* 68, 182-186.

- 46) Lin, F.H. and Thormar, H. (1972) "Properties of Maedi nucleic acid and the presence of ribonucleic acid- and deoxyribonucleic acid-dependent deoxyribonucleic acid polymerase in the virions".
J. Vir. 10, 228-233.
- 47) Parks, W.P., Todaro, G.J., Scolnick, E.M. & Aaronson, S.A. (1971) "RNA-dependent DNA polymerase in primate Syncytium-forming (foamy) viruses". Nature 229, 258-260.
- 48) Yang, W.K., Koh, C.K. & Waters, L.C. (1972) "Preparation of RNA-directed DNA polymerase from spleens of Balb/c mice infected with Rauscher Leukemia Virus". BBRC 47, 505-511.
- 49) Gallo, R.C., Gallagher, R.E., Miller, N.R., Mondal, H., Saxinger, W.C., Mayer, R.J., Smith, R.G. & Gillespie, D.H. (1975) "Relationship between components in primate RNA Tumour Viruses and in the cytoplasm of human leukemic cells. Implications to leukemogenesis". Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 19, 933-961.
- 50) Scolnick, E.M., Aaronson, S.A., Todaro, G.J. & Parks, W.P. (1971) "RNA-dependent DNA polymerase activity in mammalian cells". Nature 229, 318-321.
- 51) Penner, P.E., Cohen, L.H. & Loeb, L.A. (1971) "RNA-dependent DNA polymerase: Presence in normal human cells". BBRC 42, 1228-1234.
- 52) Stavrianopoulos, J.G., Karkas, J.D. & Chargaff, E. (1971) "Nucleic acid polymerases of the developing chicken embryo: A DNA polymerase preferring a hybrid template". PNAS 68, 2207-2211.
- 53) Maia, J.C.C., Rougeon, F. & Chapeville, F. (1971) "Chick embryo poly (rA:dT)-dependent DNA polymerase". FEBS Letters 18, 130-134.

- 54) Penner, P.E., Cohen, L.H. & Loeb, L.A. (1971) "RNA-dependent DNA polymerase in human lymphocytes during gene activation by phythaemagglutinin". *Nature New Biology* 232, 58-61.
- 55) Fridlender, B., Fry, M., Bolden, A. & Weissbach, A. (1972) "A new synthetic RNA-dependent DNA polymerase from human tissue culture cells". *PNAS* 69, 452-455.
- 56) Ward, D.C., Humphreys, K.C. & Weinstein, I.B. (1972) "Synthetic RNA-dependent DNA polymerase activity in normal rat liver and hepatomas". *Nature* 237, 499-503.
- 57) Stavrianopoulos, J.G., Karkas, J.D. & Chargaff, E. (1972) "DNA polymerase of chicken embryo: purification and properties". *PNAS* 69, 1781-1785.
- 58) Mayer, R.J., Smith, R.G. & Gallo, R.C. (1974) "Reverse transcriptase in normal Rhesus Monkey placenta". *Science* 185, 864-867.
- 59) Benveniste, R.E., Lieber, M.M., Livingston, D.M., Sherr, C.J. & Todaro, G.J. (1974) "Infectious C-type virus isolated from a baboon placenta". *Nature* 248, 17-20.
- 60) Kang, C.Y. & Temin, H.M. (1972) "Endogenous RNA-directed DNA polymerase activity in uninfected chicken embryos". *PNAS* 69, 1550-1554.
- 61) Kang, C.Y. & Temin, H.M. (1973) "Early DNA-RNA complexes from the endogenous RNA-directed DNA polymerase activity of uninfected chicken embryos". *Nature New Biology* 242, 206-208.
- 62) Temin, H.M. (1971) "The provirus hypothesis: speculations on the significance of RNA-directed DNA synthesis for normal development and for carcinogenesis". *J. Nat. Canc. Inst.* 46, III-VII.

- 63) Huebner, R.J. & Todaro, G.J. (1969) "Oncogenes of RNA Tumour viruses as determinants of cancer". PNAS 64, 1087-1097.
- 64) Purchase, H.G. & Witter, R.L. (1975) "The Reticuloendotheliosis viruses". Current Topics in Microbiology and Immunology 71, 103-124.
- 65) Halpern, M.S., Wade, P., Rucker, E., Baxter-Gabbard, K.L., Levine, A.S. & Friis, R.R. (1973) "A study of the relationship of Reticuloendotheliosis virus to the Avian Leukosis-Sarcoma complex of viruses". Virology 53, 287-299.
- 66) Bolognesi, D.P. (1974) "Structural components of RNA tumour viruses". Adv. Virus Research 19, 315-319.
- 67) Collett, M.S., Kieras, R.M. & Faras, A.J. (1975) "Studies on the replication of Reticuloendotheliosis virus: detection of viral-specific DNA sequences in infected chick cells". Virology 65, 436-445.
- 68) Mizutani, S. & Temin, H.M. (1975) "Purification and properties of Spleen necrosis virus DNA polymerase". J. Vir. 16, 797-806.
- 69) Moelling, K., Gelderblom, H., Pauli, G., Friis, R.R. & Bauer, H. (1975) "A comparative study of the Avian Reticuloendotheliosis virus: relationship to Murine Leukemia virus and viruses of the Avian Sarcoma-Leukosis complex". Virology 65, 546-557.
- 70) Mizutani, S. & Temin, H.M. (1974) "Specific serological relationship among partially purified DNA polymerases of Avian Leukosis-Sarcoma viruses, Reticuloendotheliosis virus and avian cells". J. Vir. 13, 1020-1029.
- 71) Duesberg, P., Vogt, P.K., Beemon, K. & Lai, M. (1974) "Avian RNA tumour viruses: mechanism of recombination and complexity of the genome". Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biology 39, 847-857.

- 72) Wang, L.H., Duesberg, P., Mellon, P. & Vogt, P.K. (1976) "Distribution of envelope-specific and sarcoma-specific nucleotide sequences from different parents in the RNAs of avian tumour virus recombinants". PNAS 73, 1073-1077.
- 73) Tooze, J., ed. (1973). "The molecular biology of tumour viruses". Kapitel 10-13. Cold Spring Harbour Laboratory. New York.
- 74) Kacian, D.L., Watson, K.F., Burny, A. & Spiegelman, S. (1971) "Purification of the DNA polymerase of Avian Myeloblastosis virus". BBA 246, 365-383.
- 75) Grandgenett, D.P., Gerard, G.F. & Green, M. (1973) "A single subunit from Avian Myeloblastosis virus with both RNA-directed DNA-polymerase activity and Ribonuclease H activity". PNAS 70, 230-234.
- 76) Verma, J.M. (1975) "Studies on reverse transcriptase of RNA tumour viruses. I. Localization of thermolabile DNA polymerase and RNase H activities on one polypeptide". J. Vir. 15, 121-126.
- 77) Gibson, W. & Verma, J.M. (1974) "Studies on the reverse transcriptase of RNA tumour viruses: structural relatedness of two subunits of Avian RNA tumour viruses". PNAS 71, 4991-4994.
- 78) Nowinski, R.C., Watson, K.F., Yaniv, A. & Spiegelman, S. (1972) "Serological analysis of the Deoxyribonucleic acid polymerase of Avian oncornaviruses. II. Comparison of Avian Deoxyribonucleic acid polymerases". J. Vir. 10, 959-964.
- 79) Mizutani, S. & Temin, H.M. (1973) "Lack of serological relationship among DNA polymerases of Avian Leukosis-Sarcoma viruses, Reticuloendotheliosis viruses, and chicken cells". J. Vir. 12, 440-448.

- 80) Neiman, P.E. (1973) "Measurement of endogenous leukosis virus nucleotide sequences in the DNA of normal avian embryos by RNA-DNA hybridization". *Virology* 53, 196-204.
- 81) Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M. & Vogt, P.K. (1976) "DNA related to the transforming gene(s) of Avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA". *Nature* 260, 170-173.
- 82) Vogt, P.K. & Friis, R.R. (1971) "An avian leukosis virus related to RSV(O): properties and evidence for helper activity". *Virology* 43, 223-234.
- 83) Weiss, R.A., Friis, R.R., Katz, E. & Vogt, P.K. (1971) "Induction of Avian tumour viruses in normal cells by physical and chemical carcinogens". *Virology* 46, 920-928.
- 84) Dougherty, R.M. & DiStefano, H.S. (1966) "Lack of relationship between infection with Avian Leukosis virus and the presence of COFAL antigen in chick embryos". *Virology* 29, 586-595.
- 85) Weiss, R.A. (1969) "The host range of Bryan Rous sarcoma virus synthesized in the absence of helper virus". *J. Gen. Virol.* 5, 511-528.
- 86) Weiss, R.A. & Payne, L.N. (1971) "The heritable nature of the factor in chicken cells which acts as a helper virus for Rous sarcoma virus". *Virology* 45, 508-515.
- 87) Hanafusa, T., Hanafusa, H. Miyamoto, T. & Fleissner, E. (1972) "Existence and expression of tumour virus genes in chick embryo cells". *Virology* 47, 475-482.
- 88) Chen, J.H., Hayward, W.S. & Hanafusa, H. (1974) "Avian RNA tumour virus proteins and RNA in uninfected chicken embryo cells". *J. Vir.* 14, 1419-1429.

- 89) Hanafusa, H., Hanafusa, T. & Kawai, S. (1974) "Genetic control of expression of endogenous virus genes in chicken cells". *Virology* 58, 439-448.
- 90) Halpern, M.S., Bolognesi, D.P., Friis, R.R. & Mason, W.S. (1975) "Expression of the major viral glycoprotein of avian tumour virus in cells of chf(+) chicken embryos". *J. Vir.* 15, 1131-1140.
- 91) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) "Protein measurement with the Folin phenol reagent". *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 92) Marcus, S.L., Modak, M.J. & Cavalieri, L.F. (1974) "Purification of avian myeloblastosis virus DNA polymerase by affinity chromatography on polycytidylateagarose". *J. Vir.* 14, 853-859.
- 93) Watson, K.F., Nowinski, R.C., Yaniv, A. & Spiegelman, S. (1972) "Serological analysis of the deoxyribonucleic acid polymerase of avian oncornaviruses". *J. Vir.* 10, 951-958.
- 94) Szybalski, W. (1968) "Use of Cs_2SO_4 for equilibrium density gradient centrifugation". in: *Methods in Enzymology*, Vol. XII, *Nucleic Acids*, Part B, ed. by L. Grossman and K. Moldave. Academic Press, New York and London, p. 330-360.
- 95) Sober, A., ed. (1970). *Handbook of Biochemistry. Selected data for Molecular Biology*. CRC Press, p. J - 288.
- 96) Reitz, M.S., Abrell, J.W., Trainor, C.D. & Gallo, R.C. (1972) "Precipitation of Nucleic Acids with Cetyltrimethylammoniumbromide: a method for preparing viral and cellular DNA polymerase products for cesium sulfate density gradient analysis". *BBRC* 49, 30-38.
- 97) Vogt, V.M. (1973) "Purification and further properties of single-strand-specific Nuclease from *Aspergillus oryzae*". *Eur. J. Biochem.* 33, 192-200.

- 98) Spiegelman, S., Burny, A., Das, M.R., Keydar, J., Schlom, J., Travnicek, M. & Watson, K. (1970) "Characterization of the products of RNA-directed DNA polymerases in oncogenic RNA viruses". *Nature* 227, 563-567.
- 99) Laemmli, U.K. (1970) "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4". *Nature* 227, 680-685.
- 100) Ross, J., Aviv, H., Scolnick, E. & Leder, P. (1972) "In vitro synthesis of DNA complementary to purified rabbit globin mRNA". *PNAS* 69, 264-268.
- 101) Verma, I.M., Temple, G.F., Fan, H. & Baltimore, D. (1972) "In vitro synthesis of DNA complementary to rabbit reticulocyte 10 S RNA". *Nature New Biology* 235, 163-167.
- 102) Todaro, G.I. & Gallo, R.C. (1973) "Immunological relationship of DNA polymerase from human acute leukaemia virus reverse transcriptase". *Nature* 244, 206-209.
- 103) Wu, A.M., Ting, R.C.Y. & Gallo, R.C. (1973) "RNA-directed DNA polymerase and virus-induced leukemia in mice". *PNAS* 70, 1298-1302.
- 104) Wu, A.M. & Gallo, R.C. (1974) "Interaction between murine type-C virus RNA-directed DNA polymerases and rifampycin derivatives". *BBA* 340, 419-436.
- 105) Wu, A.M. & Cetta, A. (1975) "On the stimulation of viral DNA polymerase activity by nonionic detergent". *Biochemistry* 14, 789-795.
- 106) Zhdanov, V.M. (1975) "Integration of viral genomes". *Nature* 256, 471-473.
- 107) Simpson, R.M. & Iinuma, M. (1975) "Recovery of infectious proviral DNA from mammalian cells infected with respiratory syncytial virus". *PNAS* 72, 3230-3234.

G. DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Dr. P. H. Hofschneider danke ich für Arbeitsplatz, Mittel und Unterstützung der durchgeführten Arbeit.

Herrn Prof. Dr. F. Kaudewitz danke ich für die Vertretung dieser Arbeit und für sein Interesse.

Frau G. Jilek hat durch sorgfältiges und mitverantwortliches Arbeiten wesentlich zur Durchführung des Projektes beigetragen. Ihr gilt an dieser Stelle mein besonderer Dank.

Frl. T. Jelve, Frau I. Dick und Frl. R. Soo danke ich für Mithilfe bei der "Partikelernte", Herrn Dr. H. Delius und Frau I. Scholz für elektronenmikroskopische Untersuchungen.

Herrn Dr. E. Vielitz und der Lohmann Tierzucht, Cuxhaven danke ich für eine große Menge virusfreier und kostenloser Eier.

Durch Überlassung wertvoller Materialien und Durchführung von Kontrollexperimenten wurde die Arbeit in der vorliegenden Form erst möglich gemacht. Mein Dank gilt deshalb besonders:

Frl. Dr. K. Moelling, Berlin und den Professoren P. Duesberg, Berkeley; R. R. Friis, Gießen; R. Gallo und seiner Arbeitsgruppe, Bethesda; S. Spiegelman und seiner Arbeitsgruppe, New York; A. Vaheri, Helsinki sowie Dr. B. v. Dorp und Dr. B. Martin aus unserer Arbeitsgruppe.

Herrn Dr. M. Modak danke ich für wertvolle Hinweise auf experimentelle Details.

Vielen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe bin ich für Diskussionen und Kritik zu Dank verpflichtet.

Frl. M. Ruppert danke ich für die sorgfältige Anfertigung einer ansprechenden Reinschrift.

LEBENS LAUF

Am 22. Januar 1947 wurde ich als zweiter Sohn des Volksschullehrers Max Bauer und seiner Ehefrau Else, geborene Walther, in der Marktgemeinde Stammbach/Kreis Hof, geboren. Meine Kindheit und Jugend verbrachte ich im Elternhaus.

Von September 1953 bis Juli 1957 besuchte ich die Elisabeth-Schlemmer-Volksschule in Stammbach und trat im September 1957 in die Oberrealschule Münchberg, das spätere Naturwissenschaftlich-Mathematische Gymnasium ein. Dort legte ich im Juli 1966 die Reifeprüfung ab und erwarb die Berechtigung für ein Stipendium nach dem Bayer. Begabtenförderungsgesetz.

Von Oktober 1966 bis März 1968 war ich als Wehrpflichtiger eingezogen.

Im Sommersemester 1968 nahm ich an der Ludwig-Maximilians-Universität das Studium der Biologie auf, legte im Oktober 1970 die Diplomvorprüfung und im Februar 1973 die Diplomhauptprüfung ab. Im März 1972 begann ich am Max-Planck-Institut für Biochemie unter Anleitung von Prof. Dr. P. H. Hofschneider mit der Diplomarbeit; nach deren Abgabe erhielt ich im Juli 1974 das Diplom im Fach Biologie.

Seit Sommer 1974 beschäftige ich mich, in der selben Arbeitsgruppe, mit Problemen der Reversen Transkription; daraus entstand die vorliegende Arbeit. Seit April 1975 bin ich Wiss. Assistent an diesem Institut.

Seit Mai 1971 bin ich mit meiner Frau Brigitte, geb. Rausch, verheiratet.

Im November 1976 erhielt ich, zusammen mit Prof. Hofschneider, für die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit den "Gerhard-Domagk-Preis".

